

PRISCILA BACARIN HERMANN

AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM CRIANÇAS  
COM DOENÇA FALCIFORME ANTES E DURANTE O TRATAMENTO COM  
HIDROXIUREIA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof. Dra. Maria Suely Soares Leonart

Co-orientadores: Prof. Dr. Railson Henneberg  
Prof. Dr. Aguinaldo José do Nascimento

CURITIBA

2015

Hermann, Priscila Bacarin

Avaliação de parâmetros de estresse oxidativo em crianças com doença falciforme antes e durante o tratamento com hidroxiureia / Priscila Bacarin Hermann – Curitiba, 2015.  
135 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm.

Orientadora: Professora Dra. Maria Suely Soares Leonart

Coorientador: Professor Dr. Railson Henneberg

Coorientador: Professor Dr. Aguinaldo José do Nascimento

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. 2015.

Inclui bibliografia

1. Estresse oxidativo. 2. Doença falciforme. 3. Hidroxiureia. I. Leonart, Maria Suely Soares.  
II. Henneberg, Railson. III. Nascimento, Aguinaldo José do. IV. Universidade Federal do Paraná.  
V. Título.

CDD 616.1527

# TERMO DE APROVAÇÃO

**PRISCILA BACARIN HERMANN**

**Título: "Avaliação de parâmetros de estresse oxidativo em crianças com doença falciforme antes e durante o tratamento com hidroxiureia"**

**Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Doutor, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Análises Clínicas.**

  
Prof.ª Dr.ª Maria Suely Soares Leonart  
Orientadora

  
Prof. Dr. Ralson Henneberg  
Co-orientador

  
Prof. Dr. Carlos Alberto Mayora Aita  
Pontifícia Universidade Católica do Paraná

  
Prof.ª Dr.ª Marilene da Costa Santos  
Pontifícia Universidade Católica do Paraná

  
Prof.ª Dr.ª Mara Albanei Dudeque Pianovski  
Universidade Federal do Paraná

  
Prof.ª Dr.ª Andrea Emilia Marques Stinghen  
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 21 de setembro de 2015.

Para Jociel,  
amigo, companheiro,  
e grande amor da minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por ter me dado forças e sempre atender às minhas orações.

A meus pais Maria Eunice Bacarin Hermann e Marcos Aurélio Hermann pelo incentivo constante.

A meu marido Jociel Bordignon, pelo apoio incondicional. Por nunca ter me deixado desistir, mesmo nos momentos mais difíceis. Por ter sido exemplo de dedicação e perseverança, meu porto seguro e por todo o amor que me concede diariamente.

A minha orientadora, professora Maria Suely Soares Leonart, que me aceitou em seu grupo de pesquisa e me deu a oportunidade de ampliar os horizontes, por sua amizade e todo o conhecimento repassado.

Ao meu co-orientador professor Aguinaldo José do Nascimento, por sua paciência e prontidão em ajudar sempre.

Ao meu amigo e também co-orientador professor Railson Henneberg, que me convidou para esse projeto, sempre acreditou em meu potencial e sempre será meu exemplo.

Às pessoas queridas do laboratório escola, especialmente professora Aline Borsato Hauser, pelo companheirismo e incentivo. A minha amiga do coração Juliana Spezia, o grande presente desse doutorado, pelo ombro amigo, lágrimas derramadas e muitas risadas.

A toda equipe do laboratório vizinho, de bioquímica clínica, pelos equipamentos compartilhados e conversas animadas. A todos do programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade. A Maria da Graça, farmacêutica responsável pela central analítica, por sua grande ajuda e dedicação.

A Dra. Mara Albonei Dudeque Pianovski, que me abriu as portas do Ambulatório de Hematopediatria Menino Jesus do Hospital de Clínicas da UFPR, pela simplicidade e delicadeza. A toda equipe médica, Dra. Leniza, Joanna, Adriana e Mariana, sempre atenciosas. E a toda equipe de enfermagem do Ambulatório Menino Jesus, pela imensa ajuda com a coleta das amostras, pelos abraços apertados, conversas e sorrisos, pela simpatia e acolhimento e pelo imenso e contagiante amor pelos pacientes. Também à Associação Paranaense de Apoio à Criança com Neoplasia (APACN) que

mantém a estrutura do Ambulatório e luta constantemente para melhorar a qualidade do atendimento às crianças

A todas as crianças que, literalmente, deram o sangue por esse trabalho. São apaixonantes e merecem todo cuidado. Que Deus as abençoe!

A todos os meus colegas de trabalho, pela força.

Aos meus amigos queridos pelo apoio, mesmo que em pensamento. Ana Clara, Isabela, Marina e Yara, minhas amadas. E especialmente a Bruno Madruga, que “sempre quis ter uma amiga doutora”, e me incumbiu de realizar seu desejo...

*"A sabedoria é o principal; adquiere, pois a sabedoria, empregue tudo o que possui na aquisição de entendimento. Exalte a sabedoria e ela o exaltará. Abrace-a, e ela o honrará. Ela dará à tua cabeça um diadema de graça e uma coroa de glória te entregará"*

*Provérbios 4:7-9.*

## RESUMO

Doença Falciforme (DF) é uma doença autossômica recessiva caracterizada por uma mutação pontual na molécula da hemoglobina. A DF é considerada problema de saúde pública em diversos países, além de ser a doença hematológica hereditária mais comum em todo o mundo. O estresse oxidativo representa um importante complicador da DF e tem sido sugerido que a hidroxiureia, melhor alternativa para o tratamento da doença, possa agir como antioxidante. O objetivo deste trabalho foi determinar oito parâmetros de estresse oxidativo em eritrócitos de pacientes pediátricos com DF antes e durante o tratamento com hidroxiureia, em comparação a grupo de crianças saudáveis. Após a conscientização e consentimento informado dos responsáveis, foram obtidas amostras de sangue de 41 crianças com DF (19 do sexo masculino e 22 do sexo feminino com idade média de 9 anos; variando de 2 a 14 anos) e 280 amostras de sangue de crianças saudáveis (137 do sexo masculino e 143 do sexo feminino com idade média de 10 anos; variando de 7 a 11 anos), como grupo controle. Foram determinados parâmetros hematológicos e os marcadores de estresse oxidativo meta-hemoglobina e de hemólise, concentrações de glutathione reduzida (GSH), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e espécies reativas de oxigênio (ERO), além das atividades das enzimas glucose6-fosfato desidrogenase (G6-PD), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). Os dados foram analisados utilizando-se o teste *t* de Student e análise de variância ANOVA seguida de teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Foram observadas diferenças significativas entre as crianças com DF e o grupo controle para os parâmetros laboratoriais: contagem de eritrócitos ( $p < 0,001$ ), dosagem de hemoglobina ( $p < 0,001$ ), hematócrito ( $p < 0,001$ ), volume corpuscular médio (VCM) ( $p < 0,05$ ), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) ( $p < 0,01$ ), contagem de leucócitos ( $p < 0,001$ ) e contagem de plaquetas ( $p < 0,001$ ). Os pacientes com DF estudados apresentaram altas concentrações de HbF (DF=7,9%; VR=0–1,0%). No estudo do estresse oxidativo, as diferenças foram significativas para meta-hemoglobina ( $p < 0,001$ ), TBARS ( $p < 0,001$ ), hemólise ( $p < 0,001$ ), G6-PD ( $p < 0,001$ ) e ERO ( $p < 0,001$ ). Com relação aos resultados nos pacientes antes e durante o tratamento com hidroxiureia, foram observadas diferenças significativas para VCM ( $p < 0,001$ ), contagem de leucócitos ( $p < 0,001$ ) e porcentagem de hemoglobina fetal (HbF) ( $p < 0,05$ ). Para os parâmetros relacionados ao estresse oxidativo, foram observadas diferenças significativas para meta-hemoglobina ( $p < 0,001$ ), TBARS ( $p < 0,05$ ), atividade da catalase ( $p < 0,001$ ) e ERO ( $p < 0,05$ ). Os resultados encontrados confirmaram alterações hematológicas já conhecidas da DF, resultantes da hemólise crônica, bem como o metabolismo oxidativo exacerbado na doença. Após o tratamento com hidroxiureia foram observadas reduções nas contagens de leucócitos e aumentos no VCM e nas concentrações de HbF, confirmando a adesão ao tratamento. Com relação aos parâmetros relacionados ao estresse oxidativo, houve diminuições para meta-hemoglobina, TBARS, atividade enzimática da catalase e ERO, sugerindo uma possível ação antioxidante da hidroxiureia, *in vivo*. Estes parâmetros demonstraram grande utilidade como biomarcadores da gravidade da doença, o que pode proporcionar informações mais completas sobre o tratamento e o acompanhamento dos pacientes com DF.

Palavras-chave: Estresse oxidativo; Doença Falciforme; Hidroxiureia.



## ABSTRACT

Sickle Cell Disease (SCD) is an autosomal recessive disease characterized by a mutation in hemoglobin. SCD is considered a serious public health problem in several countries, besides it is the most common hereditary blood disease worldwide. Oxidative stress is an important complication of SCD and has been suggested that hydroxyurea, the best alternative for the treatment of the disease, can act as an antioxidant. The objective of this study was to determine eight parameters of oxidative stress in erythrocytes of pediatric patients with SCD before and during treatment with hydroxyurea, comparing with healthy children. After informed consent, blood samples were obtained from 41 children with SCD (19 males and 22 females with a mean age of 9 years, range: 2-14 years) and 280 blood samples from healthy children (137 males and 143 females with a mean age of 10 years, range: 7-11 years), as a control group. All blood samples were analyzed for methemoglobin, hemolysis, reduced glutathione (GSH), thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), reactive oxygen species (ROS) and activity of the enzymes glucose6-phosphate dehydrogenase (G6-PD), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT). Data were analyzed using Student *t* test and analysis of variance ANOVA with Tukey test ( $p < 0.05$ ). Significant differences were observed among children with SCD and control group for laboratory parameters: red blood cell count ( $p < 0.001$ ), hemoglobin ( $p < 0.001$ ), hematocrit ( $p < 0.001$ ), mean corpuscular volume (MCV) ( $p < 0.05$ ), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) ( $p < 0.001$ ), leukocyte ( $p < 0.001$ ) and platelet ( $p < 0.001$ ). Patients with SCD showed high concentrations of HbF (SCD=7,9%; VR=0 to 1,0%). In the study of oxidative stress, the differences were significant for methemoglobin ( $p < 0.001$ ), TBARS ( $p < 0.001$ ), hemolysis ( $p < 0.001$ ), G6-PD ( $p < 0.001$ ) and ROS ( $p < 0.001$ ). For results in patients with SCD before and during treatment with hydroxyurea, it were observed significant differences in MCV ( $p < 0.001$ ), leukocyte ( $p < 0.001$ ) and percentage of HbF ( $p < 0.05$ ). For the parameters related to oxidative stress, significant differences were observed for methemoglobin ( $p < 0.001$ ), TBARS ( $p < 0.05$ ), catalase activity ( $p < 0.001$ ) and ROS ( $p < 0.05$ ). The results confirmed already known hematological changes in SCD, resulting from chronic hemolysis, as well as the high level of oxidative metabolism in this disease. After treatment with hydroxyurea were observed reductions in leukocyte counts and increases in VCM and the HbF concentrations, confirming adherence to treatment. With regard to parameters related to oxidative stress, there were decreases in methemoglobin, TBARS, enzymatic activity of catalase and ERO, suggesting a possible antioxidant action of hydroxyurea *in vivo*. These parameters have shown great utility as biomarkers of disease severity, which can provide more complete information on the treatment and accomplishment of patients with SCD.

Key words: Oxidative stress; Sickle cell disease; Hydroxyurea.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	DISTRIBUIÇÃO E PREVALÊNCIA DO TRAÇO E DA ANEMIA FALCIFORME EM ALGUNS ESTADOS BRASILEIROS.....	19
FIGURA 2	MOLÉCULA DA HEMOGLOBINA.....	21
FIGURA 3	EXTENSÃO SANGUÍNEA DE PACIENTE COM ANEMIA FALCIFORME, MOSTRANDO DREPANÓCITOS.....	22
FIGURA 4	PROCESSO FISIOPATOLÓGICO DERIVADO DA POLIMERIZAÇÃO DA HBS DESOXIGENADA.....	23
FIGURA 5	REDUÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE DO ÓXIDO NITRÍCO PELA HEMÓLISE INTRAVASCULAR NA DOENÇA FALCIFORME.....	25
FIGURA 6	AUMENTO DO CONSUMO INTRAVASCULAR DE ÓXIDO NÍTRICO NA DOENÇA FALCIFORME.....	26
FIGURA 7	AUMENTO DA ADESÃO ERITROCITÁRIA NA DOENÇA FALCIFORME.....	27
FIGURA 8	INFLAMAÇÃO VASCULAR NA DOENÇA FALCIFORME.....	28
FIGURA 9	AUMENTO DA ATIVIDADE COAGULANTE NA DOENÇA FALCIFORME.....	29
FIGURA 10	VASO-OCCLUSÃO NA DOENÇA FALCIFORME.....	29
FIGURA 11	MOLÉCULA DA HIDROXIUREIA.....	32
FIGURA 12	MECANISMOS DE AÇÃO ENVOLVIDOS NOS EFEITOS BENÉFICOS DA HIDROXIUREIA NA DOENÇA FALCIFORME.....	33
FIGURA 13	EFEITOS FISIOLÓGICOS DA HIDROXIUREIA NA DOENÇA FALCIFORME.....	35
FIGURA 14	BALANÇO ENTRE A PRODUÇÃO DE ERO E DE ANTIOXIDANTES.....	39
FIGURA 15	MODELO PROPOSTO PARA A PARTICIPAÇÃO DE ERO DERIVADOS DE ERITRÓCITOS NA FISIOPATOLOGIA DA DF.....	42
FIGURA 16	FLUXOGRAMA DO PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS .....	47
FIGURA 17	REAÇÃO PARA DETECÇÃO DA GLUTATIONA.....	50
FIGURA 18	REAÇÃO UTILIZADA PARA DETECÇÃO DE MDA EM PLASMA HUMANO.....	52
FIGURA 19	PRÍNCÍPIO DO FUNCIONAMENTO DA Sonda DCFDA.....	59

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1	CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS CONTROLE E PACIENTES COM DF ATENDIDOS NO AMBULATÓRIO DE HEMATOPEDIATRIA DO HC/UFPR.....	60
GRÁFICO 2	VALORES MÉDIOS PARA A CONTAGEM DE ERITRÓCITOS, DOSAGEM DE HEMOGLOBINA, HEMATÓCRITO E RDW EM PACIENTES COM DF ATENDIDOS NO AMBULATÓRIO DE HEMATOPEDIATRIA DO HC/UFPR ANTES E DURANTE O TRATAMENTO COM HIDROXIUREIA, CURITIBA-PR, JUNHO DE 2013 A AGOSTO DE 2015.....	63
GRÁFICO 3	VALORES MÉDIOS DE VOLUME CORPUSCULAR MÉDIO EM PACIENTES COM DF ATENDIDOS NO AMBULATÓRIO DE HEMATOPEDIATRIA DO HC/UFPR ANTES E DURANTE O TRATAMENTO COM HIDROXIUREIA, CURITIBA-PR, JUNHO DE 2013 A AGOSTO DE 2015.....	64
GRÁFICO 4	VALORES MÉDIOS DAS CONTAGENS DE LEUCÓCITOS EM PACIENTES COM DF ATENDIDOS NO AMBULATÓRIO DE HEMATOPEDIATRIA DO HC/UFPR ANTES E DURANTE O TRATAMENTO COM HIDROXIUREIA, CURITIBA-PR, JUNHO DE 2013 A AGOSTO DE 2015.....	65
GRÁFICO 5	VALORES MÉDIOS DAS CONTAGENS DE PLAQUETAS EM PACIENTES COM DF ATENDIDOS NO AMBULATÓRIO DE HEMATOPEDIATRIA DO HC/UFPR ANTES E DURANTE O TRATAMENTO COM HIDROXIUREIA, CURITIBA-PR, JUNHO DE 2013 A AGOSTO DE 2015.....	66
GRÁFICO 6	VALORES MÉDIOS DAS PORCENTAGENS DE RETICULÓCITOS EM PACIENTES COM DF ATENDIDOS NO AMBULATÓRIO DE HEMATOPEDIATRIA DO HC/UFPR ANTES E DURANTE O TRATAMENTO COM HIDROXIUREIA, CURITIBA-PR, JUNHO DE 2013 A AGOSTO DE 2015.....	66
GRÁFICO 7	VALORES DE HbF EM PACIENTES COM DF ATENDIDOS NO AMBULATÓRIO DE HEMATOPEDIATRIA DO HC/UFPR ANTES E DURANTE O TRATAMENTO COM HIDROXIUREIA, CURITIBA-PR, JUNHO DE 2013 A AGOSTO DE 2015.....	67
GRÁFICO 8	PORCENTAGENS DE META-HEMOGLOBINA NOS PACIENTES COM DF ATENDIDOS NO AMBULATÓRIO DE HEMATOPEDIATRIA DO HC/UFPR EM COMPARAÇÃO COM O GRUPO CONTROLE.....	73
GRÁFICO 9	VALORES DE META-HEMOGLOBINA NOS PACIENTES COM DF ATENDIDOS NO AMBULATÓRIO DE HEMATOPEDIATRIA DO HC/UFPR ANTES E DURANTE O TRATAMENTO COM HIDROXIUREIA, CURITIBA-PR, JUNHO DE 2013 A AGOSTO DE 2015.....	74
GRÁFICO 10	DOSAGEM DE GSH NOS PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME ATENDIDOS NO AMBULATÓRIO DE HEMATOPEDIATRIA DO HC/UFPR EM COMPARAÇÃO COM O GRUPO CONTROLE.....	75
GRÁFICO 11	VALORES DE GSH NOS PACIENTES COM DF ATENDIDOS NO AMBULATÓRIO DE HEMATOPEDIATRIA DO HC/UFPR EM ANTES E DURANTE O TRATAMENTO COM HIDROXIUREIA, CURITIBA-PR, JUNHO DE 2013 A AGOSTO DE 2015.....	76
GRÁFICO 12	CONCENTRAÇÕES DE TBARS NOS PACIENTES COM DF ATENDIDOS NO AMBULATÓRIO DE HEMATOPEDIATRIA DO HC/UFPR EM COMPARAÇÃO COM O GRUPO CONTROLE.....	77
GRÁFICO 13	VALORES DE TBARS NOS PACIENTES COM DF ATENDIDOS NO AMBULATÓRIO DE HEMATOPEDIATRIA DO HC/UFPR EM ANTES E DURANTE O TRATAMENTO COM HIDROXIUREIA, CURITIBA-PR, JUNHO DE 2013 A AGOSTO DE 2015.....	78
GRÁFICO 14	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA G6-PD NOS PACIENTES COM DF ATENDIDOS NO AMBULATÓRIO DE HEMATOPEDIATRIA DO HC/UFPR EM COMPARAÇÃO COM O GRUPO CONTROLE.....	79
GRÁFICO 15	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA G6-PD NOS PACIENTES COM DF ATENDIDOS NO AMBULATÓRIO DE HEMATOPEDIATRIA DO HC/UFPR ANTES E DURANTE O TRATAMENTO COM HIDROXIUREIA, CURITIBA-PR, JUNHO DE 2013 A AGOSTO DE 2015.....	80
GRÁFICO 16	PORCENTAGENS DE HEMÓLISE NOS PACIENTES COM DF ATENDIDOS NO AMBULATÓRIO DE HEMATOPEDIATRIA DO HC/UFPR EM COMPARAÇÃO COM	

GRÁFICO 17	O GRUPO CONTROLE, COM ADIÇÃO DE 0-150MMOL/L DE AAPH.....	81
GRÁFICO 18	PORCENTAGENS DE HEMÓLISE NOS PACIENTES COM DF ATENDIDOS NO AMBULATÓRIO DE HEMATOPEDIATRIA DO HC/UFPR ANTES E DURANTE O TRATAMENTO COM HIDROXIUREIA COM ADIÇÃO DE 0-150 MMOL/L DE AAPH, CURITIBA-PR, JUNHO DE 2013 A AGOSTO DE 2015.....	82
GRÁFICO 19	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA CATALASE NOS PACIENTES COM DF ATENDIDOS NO AMBULATÓRIO DE HEMATOPEDIATRIA DO HC/UFPR EM COMPARAÇÃO COM O GRUPO CONTROLE.....	83
GRÁFICO 20	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA CATALASE NOS PACIENTES COM DF ATENDIDOS NO AMBULATÓRIO DE HEMATOPEDIATRIA DO HC/UFPR ANTES E DURANTE O TRATAMENTO COM HIDROXIUREIA, CURITIBA-PR, JUNHO DE 2013 A AGOSTO DE 2015.....	84
GRÁFICO 21	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA SOD NOS PACIENTES COM DF ATENDIDOS NO AMBULATÓRIO DE HEMATOPEDIATRIA DO HC/UFPR EM COMPARAÇÃO COM O GRUPO CONTROLE.....	85
GRÁFICO 22	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA SOD NOS PACIENTES COM DF ATENDIDOS NO AMBULATÓRIO DE HEMATOPEDIATRIA DO HC/UFPR ANTES E DURANTE O TRATAMENTO COM HIDROXIUREIA, CURITIBA-PR, JUNHO DE 2013 A AGOSTO DE 2015.....	86
GRÁFICO 23	DETERMINAÇÃO DE ERO NOS PACIENTES COM DF ATENDIDOS NO AMBULATÓRIO DE HEMATOPEDIATRIA DO HC/UFPR EM COMPARAÇÃO COM O GRUPO CONTROLE.....	87
	DETERMINAÇÃO DE ERO NOS PACIENTES COM DF ATENDIDOS NO AMBULATÓRIO DE HEMATOPEDIATRIA DO HC/UFPR ANTES E DURANTE O TRATAMENTO COM HIDROXIUREIA COM ADIÇÃO DE 0 E 175MMOL/L DE BHP, CURITIBA-PR, JUNHO DE 2013 A AGOSTO DE 2015.....	88

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	VALORES DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS NO GRUPO CONTROLE.....	62
TABELA 2	PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS DOS PACIENTES COM DF ATENDIDOS NO AMBULATÓRIO DE HEMATOPEDIATRIA DO HC/UFPR EM COMPARAÇÃO COM O GRUPO CONTROLE.....	62
TABELA 3	PARÂMETROS LABRATORIAIS EM PACIENTES COM DF ATENDIDOS NO AMBULATÓRIO DE HEMATOPEDIATRIA DO HC/UFPR ANTES E DEPOIS DO TRATAMENTO COM HIDROXIUREIA, CURITIBA-PR, JUNHO DE 2013 A AGOSTO DE 2015.....	68
TABELA 4	PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO NO GRUPO CONTROLE.....	69
TABELA 5	PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO NOS PACIENTES COM DF ATENDIDOS NO AMBULATÓRIO DE HEMATOPEDIATRIA DO HC/UFPR EM COMPARAÇÃO COM O GRUPO CONTROLE.....	70
TABELA 6	PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO NOS PACIENTES COM DF ATENDIDOS NO AMBULATÓRIO DE HEMATOPEDIATRIA DO HC/UFPR, SEPARADOS POR MANIFESTAÇÃO DA DOENÇA, CURITIBA-PR, JUNHO DE 2013 A AGOSTO DE 2015.....	70
TABELA 7	PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO NOS PACIENTES COM DF ATENDIDOS NO AMBULATÓRIO DE HEMATOPEDIATRIA DO HC/UFPR, SEPARADOS POR HAPLÓTIPO DO GENE DA $\beta$ GLOBINA, CURITIBA-PR, JUNHO DE 2013 A AGOSTO DE 2015.....	71
TABELA 8	PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO NOS PACIENTES COM DF ATENDIDOS NO AMBULATÓRIO DE HEMATOPEDIATRIA DO HC/UFPR ANTES E DURANTE O TRATAMENTO COM HIDROXIUREIA, CURITIBA-PR, JUNHO DE 2013 A AGOSTO DE 2015.....	72

## LISTA DE SIGLAS

FDA	- <i>Food and Drug Administration</i>
HC	- Hospital de Clínicas
MS	- Ministério da Saúde
OMS	- Organização Mundial da Saúde
PROEC	- Pró Reitoria de Extensão e Cultura
SUS	- Sistema Único de Saúde
TCLE	- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UFPR	- Universidade Federal do Paraná

## LISTA DE ABREVIATURAS

AAPH	- Dicloridrato de 2,2'-azobis-(2-metilpropanoamidina)
AVC	- Acidente vascular cerebral
CAT	- Catalase
CHCM	- Concentração de hemoglobina corpuscular média
CLAE	- Cromatografia líquida de alta eficiência
DCFDA	- Sonda diacetato de diclorodihidrofluoresceína
DCF	- 2,7-diclorofluoresceína
DCFH2	- 2',7'-diclorodihidrofluoresceína
DF	- Doença falciforme
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
DTNB	- Ácido 5,5-ditiobis (2-nitrobenzóico)
EDTA	- Ácido etilenodiaminotetracético
ERO	- Espécies reativas de oxigênio
Fe <sup>2+</sup>	- Ferro no estado reduzido, ferroso
Fe <sup>+3</sup>	- Ferro no estado oxidado, férrico
G6-P	- Glicose 6-fosfato
G6-PD	- Glicose 6-fosfato desidrogenase
GMP	- Monofosfato de guanosina
GPx	- Glutathione peroxidase
GR	- Glutathione reductase
GSH	- Glutathione reduzida

GSSG	- Glutathiona oxidada
GTP	- Guanosina trifosfato
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	- Peróxido de hidrogênio
Hb	- Hemoglobina
HbS	- Hemoglobina S
HbF	- Hemoglobina fetal
HCM	- Hemoglobina corpuscular média
LDH	- Lactato desidrogenase
MDA	- Malondialdeído
MIN	- Minutos
NAD <sup>+</sup>	- NAD na forma oxidada
NADP <sup>+</sup>	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato na forma oxidada
NADPH	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato na forma reduzida
O <sub>2</sub>	- Oxigênio molecular
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	- Radical ânion superóxido
HO <sup>•</sup>	- Radical hidroxila
PBS	- Tampão fosfato salina
RDW	- Índice de anisocitose
SOD	- Superóxido dismutase
TBARS	- Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
tBHP	- <i>terc</i> -butilhidroperóxido
VCM	- Volume corpuscular médio

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>18</b>
2.1	DOENÇA FALCIFORME.....	18
2.1.1	Fisiopatologia.....	21
2.1.2	Sinais e Sintomas.....	24
2.1.3	Tratamento .....	31
2.1.3.1	Hidroxiuréia .....	31
2.2	ESTRESSE OXIDATIVO.....	36
2.2.1	Metabolismo Antioxidante do Eritrócito.....	39
2.3	ESTRESSE OXIDATIVO NA DOENÇA FALCIFORME.....	41
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>44</b>
3.1	OBJETIVO GERAL.....	44
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	44
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>45</b>
4.1	MATERIAL.....	45
4.1.1	Reagentes .....	45
4.1.2	Critérios de Inclusão e Exclusão.....	45
4.1.3	Dados de Prontuários.....	46
4.2	MÉTODOS.....	46
4.2.1	Coleta do Material .....	46
4.2.2	Isolamento dos Eritrócitos.....	47
4.2.3	Determinação da Concentração de Meta-hemoglobina.....	47
4.2.3.1	Cálculo da concentração de meta-hemoglobina.....	48
4.2.3.2	Princípio da técnica.....	48
4.2.4	Dosagem da Concentração de Glutathione Reduzida (GSH).....	49
4.2.4.1	Cálculo da concentração de GSH.....	49
4.2.4.2	Princípio da técnica.....	50
4.2.5	Dosagem das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS).....	50
4.2.5.1	Cálculo da concentração das TBARS .....	51
4.2.5.2	Princípio da técnica.....	51
4.2.6	Determinação da Atividade Enzimática da G6-PD .....	52
4.2.6.1	Cálculo da atividade enzimática da G6-PD .....	52
4.2.6.2	Princípio da técnica.....	53
4.2.7	Determinação das Porcentagens de Hemólise.....	54
4.2.7.1	Cálculo das percentagens de hemólise .....	54
4.2.7.2	Princípio da técnica.....	54
4.2.8	Determinação da Atividade Enzimática da Catalase.....	54
4.2.8.1	Cálculo da atividade enzimática da catalase.....	55
4.2.8.2	Princípio da técnica.....	55
4.2.9	Determinação da Atividade Enzimática da SOD.....	56
4.2.9	Cálculo da atividade enzimática da SOD.....	56
4.2.9.1	Princípio da técnica.....	57
4.2.10	Determinação das Espécies Reativas de Oxigênio (ERO).....	57
4.2.10.1	Cálculo da quantidade de ERO.....	58
4.2.10.2	Princípio da técnica.....	58
4.2.11	Análise Estatística dos Resultados.....	59
<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>60</b>
5.1	CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS.....	60
5.2	TRATAMENTO COM HIDROXIUREIA.....	61
5.3	PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS.....	61
5.4	PARÂMETROS LABORATORIAIS.....	68
5.5	PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO.....	69
5.5.1	Determinação de Meta-hemoglobina.....	73
5.5.2	Concentrações de GSH.....	75
5.5.3	Concentrações das TBARS.....	77
5.5.4	Determinação da Atividade Enzimática da G6-PD.....	79
5.5.5	Determinação das Porcentagens de Hemólise.....	81



5.5.6	Determinação da Atividade Enzimática da Catalase.....	83
5.5.7	Determinação da Atividade Enzimática da Superóxido Dismutase.....	85
5.5.8	Determinação das Espécies Reativas de Oxigênio.....	87
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>89</b>
6.1	TRATAMENTO COM HIDROXIUREIA.....	90
6.2	PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS.....	93
6.2.1	Série Vermelha.....	93
6.2.2	Leucócitos e Plaquetas.....	94
6.2.3	Reticulócitos.....	95
6.2.4	Hemoglobina Fetal.....	96
6.3	PARÂMETROS LABORATORIAIS.....	96
6.4	PARÂMETROS RELACIONADOS AO ESTRESSE OXIDATIVO.....	97
6.4.1	Determinação de Meta-hemoglobina.....	100
6.4.2	Concentrações de GSH.....	101
6.4.3	Concentrações de TBARS.....	102
6.4.4	Determinações da Atividade Enzimática da G6-PD.....	103
6.4.5	Determinações das Porcentagens de Hemólise.....	104
6.4.6	Determinações da Atividade Enzimática da Catalase.....	105
6.4.7	Determinações da Atividade Enzimática da Superóxido Dismutase.....	106
6.4.8	Determinações das Espécies Reativas de Oxigênio.....	107
6.5	ANÁLISE COMPARATIVA DOS RESULTADOS.....	108
6.6	LIMITAÇÕES DO ESTUDO.....	110
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>111</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>112</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>129</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Doença falciforme (DF) é um termo genérico que engloba um grupo de doenças hemolíticas hereditárias, caracterizadas por uma alteração estrutural na molécula da hemoglobina (Hb) (HEENEY e WARE, 2008; FELIX *et al.*, 2010; HANSON *et al.*, 2011). A DF ocorre devido à substituição do ácido glutâmico por valina no sexto códon do gene da  $\beta$ -globina, gerando a variante hemoglobina S ( $HbS \rightarrow \alpha_2\beta_2^S$ ) (RAJ e BERTOLONE, 2010).

Dados divulgados do Programa Nacional de Triagem Neonatal, referentes ao período de 2001 a 2005, demonstram que as hemoglobinopatias são as doenças genéticas mais comuns nos recém-nascidos brasileiros em comparação a outras doenças diagnosticadas pelo teste de triagem neonatal (LERVOLINO *et al.*, 2011). Tal cenário permite tratar essa doença como problema de saúde pública no Brasil (SIMÕES *et al.*, 2010; SABARENSE *et al.*, 2015).

A portaria nº 1.391 de agosto de 2005 instituiu, no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS), as diretrizes para a Política Nacional de Atenção Integral às Pessoas com Doença Falciforme e outras Hemoglobinopatias, cujo objetivo é reduzir a morbidade e a mortalidade, trazendo qualidade de vida com longevidade aos pacientes (SIMÕES *et al.*, 2010). Desta forma, o prognóstico para pessoas com DF têm passado por mudanças significativas resultantes do diagnóstico precoce, educação do paciente e intervenções terapêuticas (GREEN e BARRAL, 2014; LOBO *et al.*, 2014).

A DF é uma doença crônica, degenerativa e incapacitante que afeta o paciente e sua família, de forma intensa e permanente. As complicações clínicas e hospitalizações recorrentes, associadas a domínios externos como o desemprego, baixa renda e falta de acesso aos serviços de saúde, influenciam negativamente a vida desta população (MCCAVIT *et al.*, 2011; ALJUBURI *et al.*, 2013; PEREIRA *et al.*, 2013).

Embora as fisiopatologias genética e molecular da DF sejam bem descritas e compreendidas, pouco progresso tem ocorrido para uma terapia definitiva e curativa (HEENEY e WARE, 2008). Apesar de transplante de medula óssea poder curar a DF (BRASIL, 2015), não existe medicação com comprovado efeito antifalcêmico (FELIX *et al.*, 2010) e a maioria das terapias é

apenas de suporte (SEGAL *et al.*, 2008; BRAUNWALD *et al.*, 2013; WANG, 2015).

A hidroxiureia, classificada como um agente antimetabólico e antineoplásico, oferece uma ampla gama de efeitos benéficos, que podem amenizar a gravidade clínica da DF. Seu uso foi liberado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) em 1998, para reduzir a frequência de crises dolorosas e a necessidade de transfusões sanguíneas em adultos com doença grave (HEENEY e WARE, 2008). Inúmeros estudos demonstram a eficácia e os mínimos efeitos adversos no uso da hidroxiureia também em crianças com DF (HANKINS *et al.*, 2005; HEENEY e WARE, 2008; GREENWAY *et al.*, 2011; STROUSE e HEENEY, 2012; AYGUN *et al.*, 2013).

Tem sido demonstrado que os pacientes com DF apresentam parâmetros de estresse oxidativo alterados (CHAVES *et al.*, 2008; MAGALHÃES, 2011), e uma avaliação de tais parâmetros pode proporcionar significativas informações sobre o curso da doença, o uso de medicamentos e conduzir a novas estratégias terapêuticas (BELINI JUNIOR *et al.*, 2012).

Devido a indícios de que um dos múltiplos mecanismos benéficos da hidroxiureia pode ser a sua ação antioxidante e consequente redução do estresse oxidativo sistêmico (BELINI JUNIOR *et al.*, 2012; GEORGE *et al.*, 2013), pretende-se, com este trabalho, avaliar parâmetros relacionados ao estresse oxidativo em crianças diagnosticadas com DF, antes e durante o tratamento com hidroxiureia, correlacionando estes parâmetros com dados dos prontuários dos pacientes.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 DOENÇA FALCIFORME

A anemia é uma condição caracterizada por diminuição na capacidade do sangue em transportar oxigênio. A Organização Mundial da Saúde (OMS) a define como uma concentração de hemoglobina abaixo da faixa normal para a distribuição encontrada em um grupo representativo de indivíduos (MCLELLAN *et al.*, 2003).

Nas anemias hemolíticas, a sobrevida eritrocitária está encurtada, (LEWIS *et al.*, 2006) e as hemoglobinopatias são exemplos de doenças hemolíticas crônicas devido a alterações genéticas, com altas frequências populacionais, estimando-se que haja 270 milhões de casos no mundo (SIMÕES *et al.*, 2010). O diagnóstico e o tratamento precoces aumentam a sobrevida e a qualidade de vida dos pacientes que, até o momento, não podem ser curados (RAMALHO *et al.*, 2003).

O termo doença falciforme (DF) refere-se a todos os genótipos que contêm pelo menos um gene da hemoglobina S (HbS). Anemia falciforme é o estado homozigótico (HbSS) e a forma mais grave da doença, cujos indivíduos afetados apresentam grande variedade de problemas clínicos (RAJ e BERTOLONE, 2010; BELINI JUNIOR *et al.*, 2012). Existem várias outras manifestações heterozigóticas com fenótipos mais leves, como o traço falciforme (AS) e HbSC, HbSD, HbS associada à beta-talassemia, HbS associada à persistência hereditária de hemoglobina fetal (HbF), além de outras combinações raras (SEGAL *et al.*, 2008; RAJ e BERTOLONE, 2010).

O primeiro relato científico da doença foi descrito por Herrick, em 1910 (RUIZ, 2007; SEGAL *et al.*, 2008) e a presença da HbS nos eritrócitos dos pacientes foi demonstrada por Pauling e colaboradores, em 1949 (ASLAN e FREEMAN, 2007).

Acredita-se que a mutação genética da DF teve origem na África e na Índia (RAJ e BERTOLONE, 2010). Devido às migrações populacionais, atualmente a doença é encontrada em todo o mundo, sendo a doença

hematológica hereditária mais frequente. Em certas regiões da África, 45% da população apresenta traço falciforme e, na América, cerca de 8% dos afrodescendentes carregam o gene da doença, podendo ocorrer também em indivíduos de ascendência árabe, indiana, grega ou italiana (WANG, 2004; HEENEY e WARE, 2008). No Brasil, a incidência da DF é de 1 a 3 casos por 1000 recém-nascidos, predominando entre afrodescendentes (RAMALHO *et al.*, 2003; SIMÕES *et al.*, 2010; WANG, 2015). Há cerca de 200 mil portadores de traço falciforme (HbAS) (BRASIL, 2009; LOBO *et al.*, 2014), com uma grande heterogeneidade da prevalência em diferentes estados brasileiros (Figura 1), sendo esta informação crucial para as políticas de saúde pública (CANÇADO e JESUS, 2007; LERVOLINO *et al.*, 2011). No estado do Paraná foi observada uma taxa de 1,52% para HbAS e 0,002% para HbSS (WATANABE *et al.*, 2008).

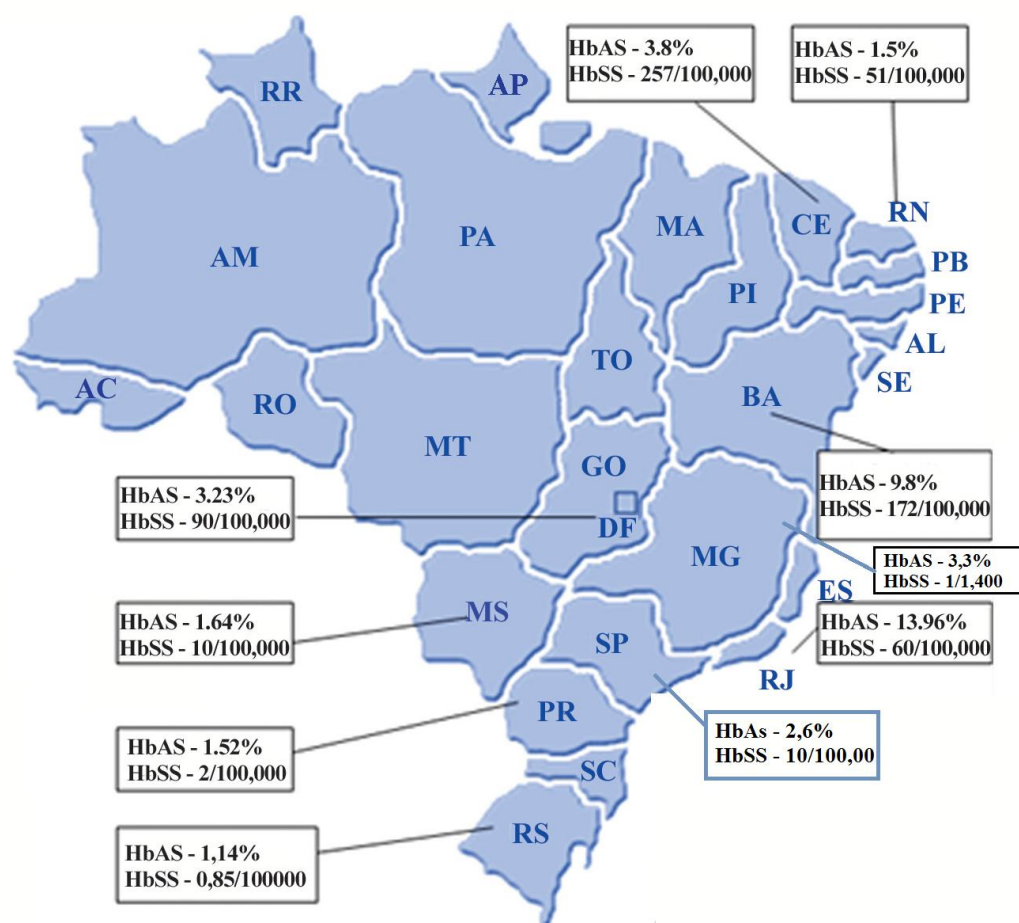


FIGURA 1 - DISTRIBUIÇÃO E PREVALÊNCIA DO TRAÇO E DA ANEMIA FALCIFORME EM ALGUNS ESTADOS BRASILEIROS  
 FONTE: MODIFICADO DE LERVOLINO *et al.* (2011)

Na década de 1980, em um grande estudo multicêntrico demonstrou-se que o tratamento precoce com penicilina em recém-nascidos com DF reduziu a mortalidade nos primeiros anos de vida. Esta descoberta foi fundamental para a implantação da detecção da HbS nos programas de triagem neonatal em muitos países (LOBO, 2010).

No Brasil, o diagnóstico precoce passou a ser realizado pelo “Teste do Pezinho” no âmbito do Programa Nacional de Triagem Neonatal, normatizado pela Portaria nº 822 de 2001 do Ministério da Saúde (MS) (BRASIL, 2001) e é fundamental para a identificação, quantificação e acompanhamento dos casos, bem como para o planejamento e organização da rede de atenção integral (BRASIL, 2013). Na DF, estas medidas devem ser implementadas dentro de 2 a 4 meses após o nascimento (LOBO *et al.*, 2014), para intervenções precoces (FELIX *et al.*, 2010; RAJ e BERTOLONE, 2010; LOBO *et al.*, 2014).

No entanto, estudos sobre a expectativa de vida do paciente com DF ainda registram pequenos percentuais de sobrevida acima dos 50 anos. No Brasil, Alves (1996) demonstrou que 78% dos óbitos ocorreram até os 29 anos de idade e a mortalidade perinatal também é elevada, variando de 20 a 50% (SIMÕES *et al.*, 2010). Em estudos mais recentes no país, Lobo *et al.* (2014) demonstraram que até 25% das crianças diagnosticadas morreram durante os primeiros 5 anos de vida, e Sabarense *et al.* (2015) concluíram que a maioria das mortes ocorreu em menores de 2 anos. Não houve registro dos termos doença falciforme ou anemia falciforme como causa de morte em número significativo destes óbitos certificados (46%), sugerindo dificuldade dos profissionais da saúde em reconhecer a doença e seus eventos. Além disso, a falta de infraestrutura e as dificuldades de acesso aos serviços de saúde e os baixos níveis socioeconômicos e educacionais das famílias foram fatores agravantes para o estado clínico das crianças (SABARENSE *et al.*, 2015).

A DF ocorre frequentemente em populações carentes (THOMPSON *et al.*, 2010) que, além dos problemas clínicos enfrentam problemas raciais, culturais, emocionais, psicológicos e socioeconômicos relacionados à doença crônica. Em estudo realizado por Felix *et al.* (2010), os pacientes relataram sentimentos de revolta ou tristeza, que estavam associados a mais crises dolorosas por ano. Desta forma, a doença se reflete negativamente nas atividades laborais e na qualidade de vida dos mesmos. Neste sentido, a

gravidade da doença é ainda maior, requerendo melhorias nas políticas públicas para esses indivíduos, tendo em conta seu baixo nível socioeconômico, características demográficas, e as dificuldades em conseguir o tratamento recomendado. E, para serem eficazes, estas medidas devem estar acompanhadas do aconselhamento psicossocial necessário (FERNANDES *et al.*, 2015).

### 2.1.1 Fisiopatologia

A hemoglobina humana (Hb) é uma das heme proteínas mais generalizada e especializada existentes na natureza, e apresenta como principal função o transporte de oxigênio para todo o organismo. A molécula de hemoglobina é aproximadamente esférica, com um diâmetro de quase 5,5 nm. Consiste em uma proteína tetramérica composta de dois pares de cadeias polipeptídicas similares chamadas globinas, que exibem um eixo de simetria. Cada uma das quatro cadeias acompanha um grupo prostético heme e um complexo de ferro (Figura 2) (TELEN e KAUFMAN, 2004).

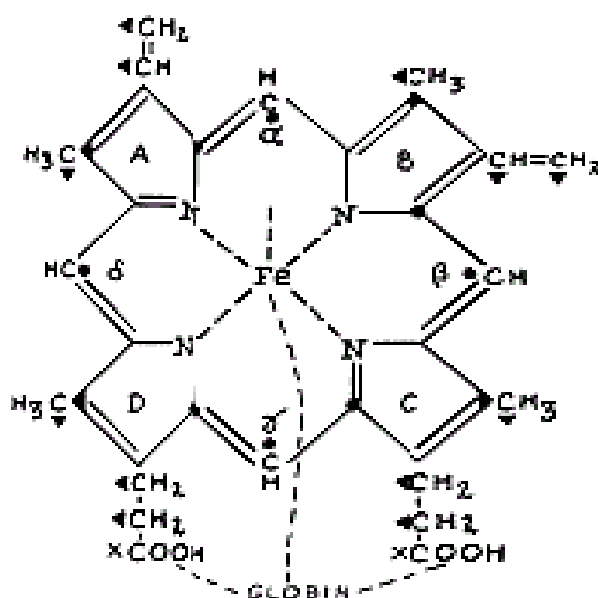


FIGURA 2 – MOLÉCULA DA HEMOGLOBINA  
FONTE: TELEN e KAUFMAN (2004)

Há sete tipos normais de hemoglobinas humanas. Destas, quatro são embrionárias transitórias, denominadas Hb Gower 1 e 2 ( $\xi 2\epsilon 2$  e  $\alpha 2\epsilon 2$ , respectivamente) e Portland 1 e 2 ( $\zeta 2\gamma 2$ ); a HbF ( $\alpha 2\gamma 2$ ), que ocorre predominantemente na vida fetal e constitui a maior proporção ao nascimento; a HbA<sub>2</sub> ( $\alpha 2\delta 2$ ) é encontrada em pequenas quantidades em adultos; e a HbA, majoritária em adultos e crianças, contém duas cadeias  $\alpha$ , cada uma com 141 resíduos de aminoácidos e duas cadeias  $\beta$ , cada uma com 146 resíduos (WILD e BAIN, 2006). Foram descritas mais de 750 variantes da Hb. As síndromes resultantes de distúrbios em sua síntese podem ocorrer por variantes estruturais da molécula, falha na síntese de uma ou mais cadeias globínicas ou falha na transição da produção de HbF a HbA. As alterações na estrutura da hemoglobina decorrem de mutações pontuais em uma ou mais bases que codificam os aminoácidos das cadeias globínicas (WILD e BAIN, 2006).

Na DF, o defeito molecular responsável pela formação da HbS ( $\alpha_2\beta_2^S$ ) resulta da substituição de adenina (A) por timina (T) no sexto códon do gene da  $\beta$ -globina (GAG  $\rightarrow$  GTG), que resulta na substituição do aminoácido normal ácido glutâmico por valina (6[A1]Glu $\rightarrow$ Val) (SCHECHTER e NOGUCHI, 1994; WANG, 2004; SEGAL *et al.*, 2008; TORRES *et al.*, 2012). A mutação  $\beta^S$  cria uma região hidrofóbica, que no estado desoxigenado facilita a polimerização não covalente das moléculas de HbS, as quais se agregam em filamentos e precipitam. A formação de cristais de HbS danifica a membrana eritrocitária e promove a desidratação celular, com estresse físico e oxidativo, conferindo ao eritrócito a típica forma de foice, pela qual é denominado drepanócito (Figura 3) (WILD e BAIN, 2006; STEINBERG, 2007; BELINI JUNIOR *et al.*, 2012).

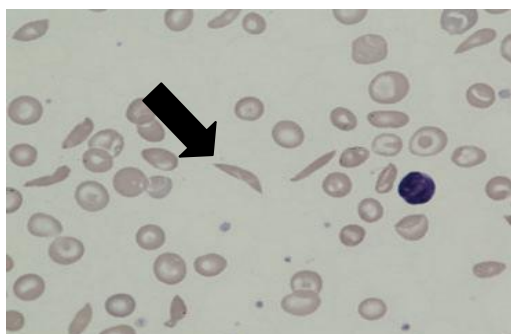


FIGURA 3 – EXTENSÃO SANGUÍNEA DE PACIENTE COM ANEMIA FALCIFORME, MOSTRANDO DREPANÓCITOS  
NOTA: Aumento de 1000x.  
FONTE: REES e GIBSON (2011)





### 2.1.2 Sinais e Sintomas

Existe grande variação na gravidade da DF, associada a diferenças na concentração total de Hb, na reologia dos eritrócitos, na proporção de células adesivas e no haplótipo da  $\beta$ -globina. Um haplótipo da HbS corresponde à associação não aleatória dos locais de clivagem de endonucleases de restrição no complexo do gene da  $\beta$ -globina (CARVALHO DOS SANTOS *et al.*, 2012).

O gene  $\beta^s$  apresenta cinco tipos principais de haplótipos, nomeados de acordo com a área geográfica de sua maior prevalência. Os grupos mais conhecidos são o Benin (BEN), República Centro Africana ou Bantu (CAR ou BAN), Senegal (SEN), Camarões (CAM) e Saudita ou Árabe-Indiano. A importância dos haplótipos da mutação  $\beta^s$  em pacientes com DF supõe-se estar relacionada à gravidade e à evolução clínica da doença, sugerindo melhores prognósticos para os haplótipos Senegal e Asiático cuja expressão fenotípica de HbF mostra-se elevada, e pior evolução clínica para os pacientes portadores dos haplótipos Benin e Bantu (SILVA e SHIMAUTI, 2006).

No entanto, a porcentagem de HbF parece ser o parâmetro laboratorial que mais influencia na gravidade clínica da doença, pois os sintomas começam no primeiro ano de vida, coincidindo com seu declínio fisiológico (WANG, 2004; HEENEY e WARE, 2008; STEINBERG *et al.*, 2010; THOMPSON *et al.*, 2010; VOSKARIDOU *et al.*, 2010; GREEN e BARRAL, 2011; REES e GIBSON, 2011). Nos pacientes com DF, a concentração de HbF varia de 1 a 20%, enquanto em adultos não afetados é inferior a 1% (HEENEY e WARE, 2008).

As células falciformes sobrevivem na circulação de 16 a 20 dias, em comparação aos 120 dias do eritrócito normal (FELIX *et al.*, 2010). Além da hemólise extravascular, ocorre também a intravascular. A presença de hemoglobina livre no plasma gera ERO, que consomem o óxido nítrico, um potente antagonista da inflamação, o que leva à disfunção endotelial vascular (Figura 5) (HANSON *et al.*, 2011; NUR *et al.*, 2011; REES e GIBSON, 2011; JONES *et al.*, 2013).

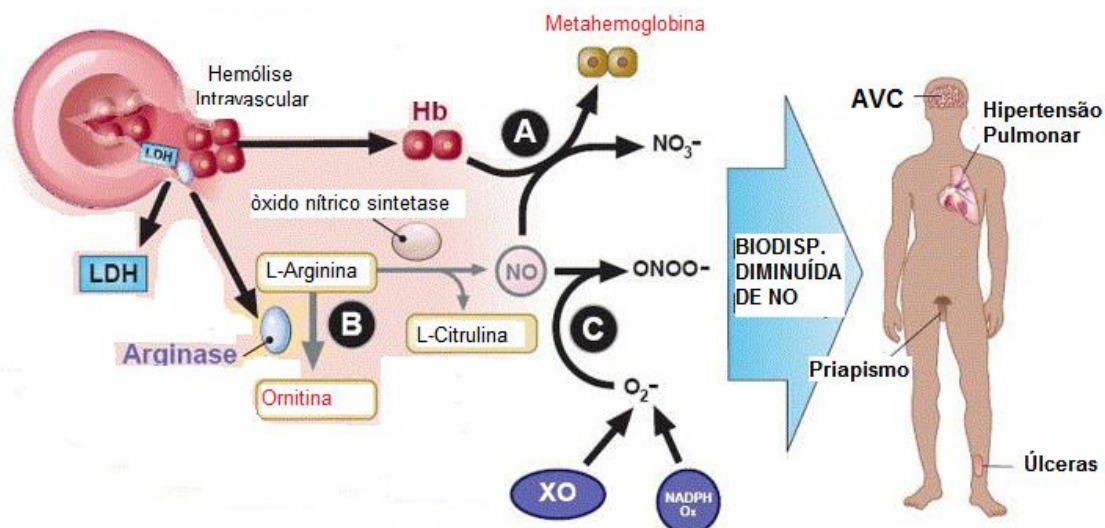


FIGURA 5 – REDUÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE DO ÓXIDO NÍTRICO PELA HEMÓLISE INTRAVASCULAR NA DOENÇA FALCIFORME

NOTA: AVC – Acidente vascular cerebral; NO – Óxido nítrico; A - Arginase no plasma transforma L-arginina em ornitina, diminuindo a biodisponibilidade do NO; B - LDH é marcador da liberação de hemoglobina e arginase. O NO é consumido pelas ERO produzidas pelos altos níveis da xantina oxidase e da NADPH oxidase, situação comum na doença falciforme; C - diminuição da biodisponibilidade do NO.

FONTE: MACK e KATO (2006)

O óxido nítrico constitui-se em potente vasodilatador produzido pela óxido nítrico sintase nas células endoteliais, a partir da L-arginina (ANTWI-BOASIAKO *et al.*, 2015). O óxido nítrico difunde-se para células musculares lisas vizinhas, onde reage com o ferro do grupo heme da guanilato ciclase, resultando em síntese aumentada de monofosfato de guanosina cíclico (cGMP) a partir de guanosina trifosfato (GTP). O GMP cíclico ativa a proteína cinase G, que estimula a ATPase dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ , diminuindo os níveis de cálcio intracelular, mediando, assim, o relaxamento de células do músculo liso. A Hb livre no plasma de pacientes com DF, resultante da hemólise intravascular, reage com o óxido nítrico, formando um complexo, convertido em meta-hemoglobina e nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) (Figura 6) (ASLAN e FREEMAN, 2007). A hemólise também pode liberar arginase, que converte o substrato para a síntese de óxido nítrico, L-arginina, a ornitina, reduzindo a disponibilidade do óxido nítrico e produzindo radicais de oxigênio (GEORGE *et al.*, 2013).

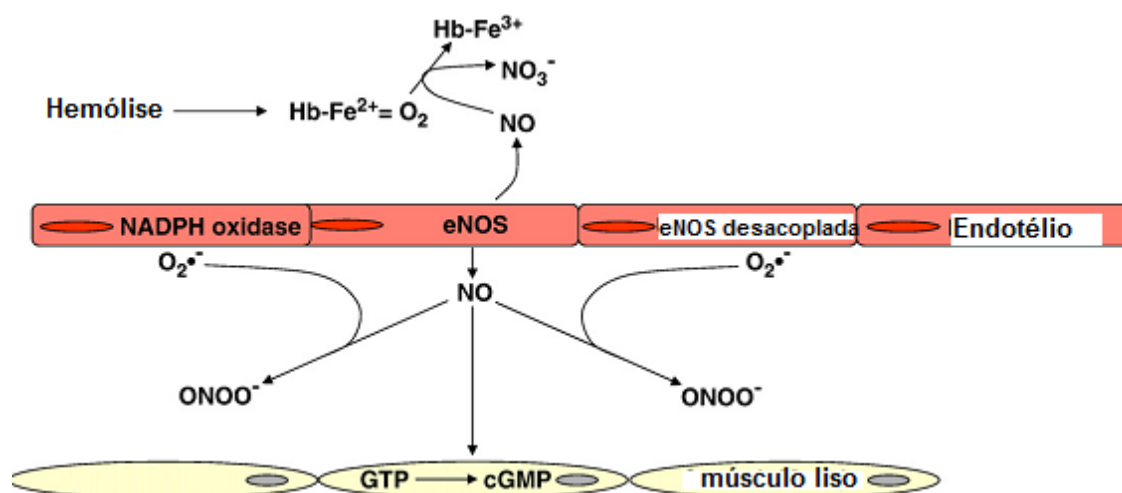


FIGURA 6 – AUMENTO DO CONSUMO INTRAVASCULAR DE ÓXIDO NÍTRICO NA DOENÇA FALCIFORME

NOTA: O ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) reage com o óxido nítrico (NO) para formar peroxinitrito ( $ONOO^-$ ). Óxido nítrico é consumido também pela hemoglobina livre no plasma, lançada pela hemólise intravascular.

eNOS – Óxido nítrico sintase endotelial

FONTE: ASLAN e FREEMAN (2007)

Os ciclos de isquemia e reperfusão ativam oxidases vasculares (BELINI JUNIOR *et al.*, 2012) e aumentam a expressão de moléculas de adesão que desempenham papel chave na patogênese da doença (REES e GIBSON, 2011). Eritrócitos contendo HbS expressam quantidades elevadas das glicoproteínas Lutheran (Lu gp) e LW (LW gp). A Lu gp libera laminina, uma proteína da matriz extracelular, que pode aderir aos eritrócitos expostos pelos danos endoteliais na DF. A LW gp, também conhecida como ICAM-4, associa-se a integrinas específicas expressas em leucócitos e plaquetas e pode ser ativada por mecanismo induzido pela epinefrina, resultando em aumento da adesividade a células endoteliais (Figura 7) (ASLAN e FREEMAN, 2007).

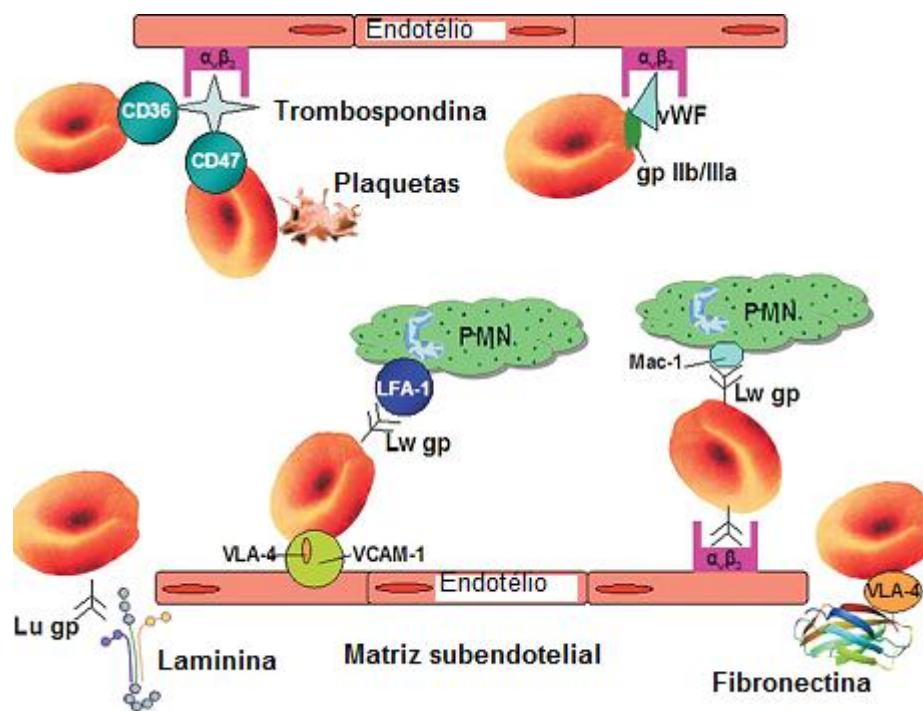


FIGURA 7 – AUMENTO DA ADESÃO ERITROCITÁRIA NA DOENÇA FALCIFORME

NOTA: Lu gp - glicoproteína Lutheran; PMN - leucócitos polimorfonucleares, VCAM1 - molécula 1 de adesão celular vascular; vWF - fator de Von Willebrand.

FONTE: ASLAN e FREEMAN (2007)

Em vários estudos têm sido demonstrado mediadores inflamatórios como IL-1 e TNF- $\alpha$ , além de contagens de leucócitos aumentadas no plasma de pacientes com DF (Figuras 8) (REES e GIBSON, 2011). O óxido nítrico é também um antagonista potente da inflamação, resultado da inibição da ativação do fator nuclear-kB (NF-kB), que controla a expressão de genes envolvidos nas respostas imune e inflamatória, como VCAM-1, ICAM-1 e E-selectina (ASLAN e FREEMAN, 2007).

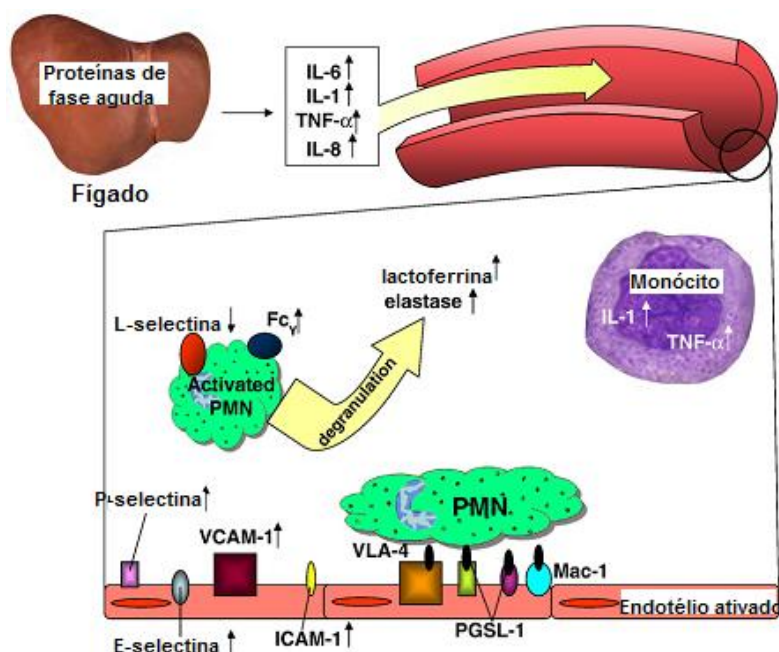


FIGURA 8 – INFLAMAÇÃO VASCULAR NA DOENÇA FALCIFORME

NOTA: PMN - leucócitos polimorfonucleares; IL-1 - interleucina-1; IL-6 - interleucina-6; IL-8 - interleucina-8; TNF-α - fator de necrose tumoral α; PGSL1- glicoproteína selectina ligante-1; Fcγ - receptor Fcγ de alta afinidade; ICAM1- molécula de adesão intercelular-1.

FONTE: ASLAN e FREEMAN (2007)

O mecanismo responsável pelo efeito vasodilatador do óxido nítrico também promove potente inibição da agregação de plaquetas. Em vários estudos tem sido constatada atividade coagulante aumentada em pacientes com DF, induzida por ativação plaquetária, geração de trombina e fibrina. Além disso, o fator tissular (FT), iniciador fisiológico da coagulação, está significativamente elevado nestes pacientes (Figura 9). Este fator, presente na superfície das células como uma proteína integral da membrana, não é expresso pelas células vasculares, porém os mediadores inflamatórios aumentados no plasma dos pacientes com DF podem induzir a sua síntese. Também tem sido demonstrado que a superfície dos eritrócitos contendo HbS expressa maiores quantidades de fosfatidilserina, com maior ativação do FT (ASLAN e FREEMAN, 2007).

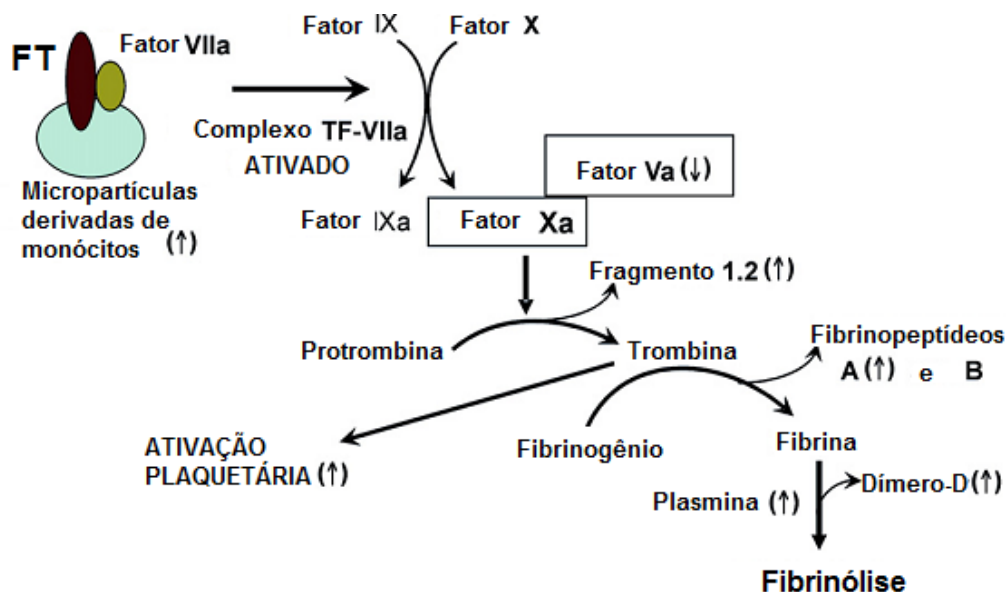


FIGURA 9 – AUMENTO DA ATIVIDADE COAGULANTE NA DOENÇA FALCIFORME

NOTA: FT – fator tissular.

FONTE: ASLAN e FREEMAN (2007)

Como resultado de todos estes eventos, a vaso-oclusão (Figura 10) e a hemólise dos eritrócitos rígidos e simultaneamente frágeis dos pacientes com DF causam várias manifestações agudas e crônicas (GEORGE *et al.*, 2013) e representam o evento fisiopatológico determinante na origem da maioria dos sinais e sintomas (FELIX *et al.*, 2010; TANTAWY *et al.*, 2015).

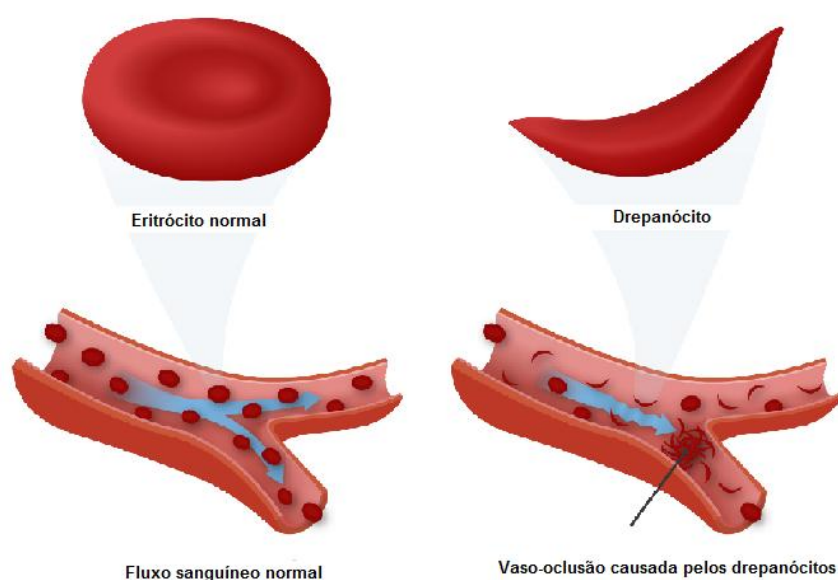


FIGURA 10 – VASO-OCCLUSÃO NA DOENÇA FALCIFORME

FONTE: GENOME RESEARCH LIMITED, 2015. Disponível em:  
(<http://www.yourgenome.org/facts/what-is-sickle-cell-anaemia>)



Em geral, nos pacientes com DF, anemia normocítica normocrômica moderada manifesta-se nos primeiros meses e persiste ao longo da vida. A concentração de Hb média é de 8,0 g/dl (WANG, 2004) e o hematócrito varia de 15 a 30% (BRAUNWALD *et al.*, 2013). Alguns pacientes podem apresentar hemólise mais grave, com reticulocitose e elevação da lactato desidrogenase (LDH) sérica, importante marcador de hemólise intravascular (STEINBERG, 2007).

Danos crônicos podem afetar quase todos os órgãos do sistema, levando a consideráveis morbidade e mortalidade em idade precoce (HANKINS *et al.*, 2005; HEENEY e WARE, 2008; THOMPSON *et al.*, 2010). As manifestações mais comuns são crises dolorosas, síndrome torácica aguda, úlceras de membros inferiores, vaso-oclusão intra-esplênica (sequestro esplênico), priapismo, acidente vascular cerebral (AVC), retinopatia, retardo de crescimento e de desenvolvimento sexual (FELIX *et al.*, 2010; SIMÕES *et al.*, 2010; JONES *et al.*, 2013).

A dor, resultante da vaso-oclusão e da isquemia, é a característica mais comum da doença e pode afetar qualquer parte do corpo, principalmente os ossos, devido ao infarto da medula óssea. Os AVC acometem 11% dos pacientes antes dos 20 anos de idade e as crianças podem ter várias anormalidades anatômicas e fisiológicas que envolvem o sistema nervoso central (RAJ e BERTOLONE, 2010).

Manifestações clínicas renais ocorrem devido à falcização dos eritrócitos na medula dos rins (AYGUN *et al.*, 2013) e complicações cardiovasculares e pulmonares também são comuns nesses pacientes (FELIX *et al.*, 2010; STEINBERG *et al.*, 2010). Os eritrócitos falciformes mais rígidos podem obstruir e danificar o baço, o que resulta em extrema suscetibilidade a infecções, principalmente respiratórias, osteomielite e meningite, com taxa de mortalidade de 10 a 30% (RAJ e BERTOLONE, 2010).

Em crianças, as infecções causadas por bactérias encapsuladas respiratórias como *Streptococcus pneumoniae* e o sequestro esplênico são as principais causas de mortalidade. Estas começam após os primeiros 2 meses de vida e afetam 20 a 25% das crianças antes dos 5 anos de idade. Ao longo dos anos, os AVC representam o fator determinante para danos em órgãos, bem como retardo no crescimento e na maturação sexual (LERVOLINO *et al.*,



2011). Em adultos, as causas de óbito mais comuns são falência dos órgãos, crise vaso-oclusiva aguda e AVC (SIMÕES *et al.*, 2010).

### 2.1.3 Tratamento

Os tratamentos mais comuns para a DF são apenas de suporte, com o uso de ácido fólico, hidroxiureia e transfusões sanguíneas (FELIX *et al.*, 2010), além da utilização de penicilina profilática, vacinas de rotina, hidratação e terapia analgésica (SEGAL *et al.*, 2008). A transfusão sanguínea é um recurso terapêutico muito utilizado, pois previne complicações graves (FELIX *et al.*, 2010) e diminui os sintomas e as complicações vasculares (WANG, 2004; VICHINSKY *et al.*, 2006; CANÇADO, 2007; RAJ e BERTOLONE, 2010; SIMÕES *et al.*, 2010; BELINI JUNIOR *et al.*, 2012). Contudo, existe morbidade significativa associada às transfusões, com fatores como infecções, aloimunização e sobrecarga de ferro bem reconhecidos (FELIX *et al.*, 2010; GREENWAY *et al.*, 2011).

O transplante de medula óssea de sucesso pode curar a anemia falciforme (STEINBERG, 2007) e foi incorporado ao SUS pelo MS normatizado pela portaria número 30 de 30 de junho de 2015 (BRASIL, 2015). No entanto o tratamento exige doador com HLA totalmente compatível e, mesmo nestas condições, permanece associado a consideráveis morbidade e mortalidade (HEENEY e WARE, 2008; RAJ e BERTOLONE, 2010).

A hidroxiureia surgiu como opção no tratamento da DF e vários estudos têm demonstrado sua eficácia e segurança no tratamento, tanto de adultos como de crianças (ASLAN e FREEMAN, 2007; FELIX *et al.*, 2010; SIMÕES *et al.*, 2010; BELINI JUNIOR *et al.*, 2012), chegando a ser prevista como a terapia farmacológica de escolha para a doença no futuro (GREEN e BARRAL, 2014).

#### 2.1.3.1 Hidroxiureia

A hidroxiureia foi sintetizada pela primeira vez em 1869, na Alemanha, por Dressler e Stein (Figura 11). Trata-se de um agente citotóxico, antimetabólico e antineoplásico, aprovado pelo FDA em 1967, para o

tratamento de neoplasias mieloproliferativas e leucemia mielóide crônica (MCGANN e WARE, 2011).

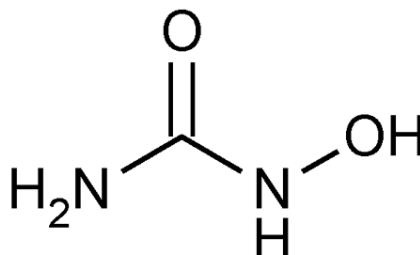


FIGURA 11 – MOLÉCULA DA HIDROXIUREIA

FONTE: U.S.PHARMACOPEIA 31, 2008-2010. Disponível em:  
(<http://www.pharmacopeia.cn/uspsp>)

A primeira aplicação clínica da hidroxíureia na DF foi relatada por Platt *et al.* (1984), que observaram um aumento drástico e rápido da concentração da HbF em reticulócitos, sem toxicidade significativa da medula óssea. Observações clínicas subsequentes sugeriram que os aumentos na HbF poderiam inibir a polimerização da HbS (CHARACHE *et al.*, 1995).

Em estudo realizado em adultos com anemia falciforme tratados com hidroxíureia, Charache *et al.* (1992) demonstraram significativos aumentos na Hb total e HbF. A macrocitose, observada por um aumento do volume corpuscular médio (VCM), foi relatada como um resultado surpreendente e os efeitos tóxicos foram mínimos, a curto prazo. Anos depois, Charache *et al.* (1995) relataram que os pacientes que receberam a hidroxíureia tiveram menor taxa de eventos dolorosos, síndrome torácica aguda, necessidade de transfusões sanguíneas e hospitalizações, em comparação com pacientes recebendo placebo. A terapia foi segura e os efeitos positivos foram evidentes após quatro meses de tratamento. Ferster *et al.* (1996) verificaram os mesmos efeitos clínicos e laboratoriais, sem nenhuma toxicidade relevante, em crianças com anemia falciforme gravemente afetadas, após seis meses de tratamento com hidroxíureia. Em 1998, o medicamento foi liberado pelo FDA para o tratamento da DF em adultos, com redução de 50% nas internações e economia de 26 milhões de dólares ao ano (SEGAL *et al.*, 2008).

Após esta aprovação, em vários estudos, tem-se avaliado seus efeitos a longo prazo. Steinberg *et al.* (2010) e Voskaridou *et al.* (2010) relataram

resultados positivos do tratamento em adultos. Kinney *et al.* (1999), Thornburg *et al.* (2009) e Lobo *et al.* (2010) demonstraram efeitos semelhantes em crianças e Thompson *et al.* (2010) descreveram os resultados de ensaio clínico realizado em bebês de 9 a 17 meses de idade.

Os resultados laboratoriais descritos em todos estes estudos foram consistentes e significativos, com aumentos nas concentrações de Hb total, HbF e VCM; melhora na morfologia e deformabilidade dos eritrócitos; redução significativa da hemólise, do número de leucócitos, plaquetas, reticulócitos e moléculas de adesão, além de um estímulo à produção de óxido nítrico (Figura 12) (CHARACHE, *et al.*, 1995; ASLAN e FREEMAN, 2007; FELIX *et al.*, 2010; SIMÕES *et al.*, 2010; STEINBERG *et al.*, 2010; THOMPSON *et al.*, 2010; VOSKARIDOU *et al.*, 2010; MCGANN e WARE, 2011; BELINI JUNIOR *et al.*, 2012; COLELLA *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2013).

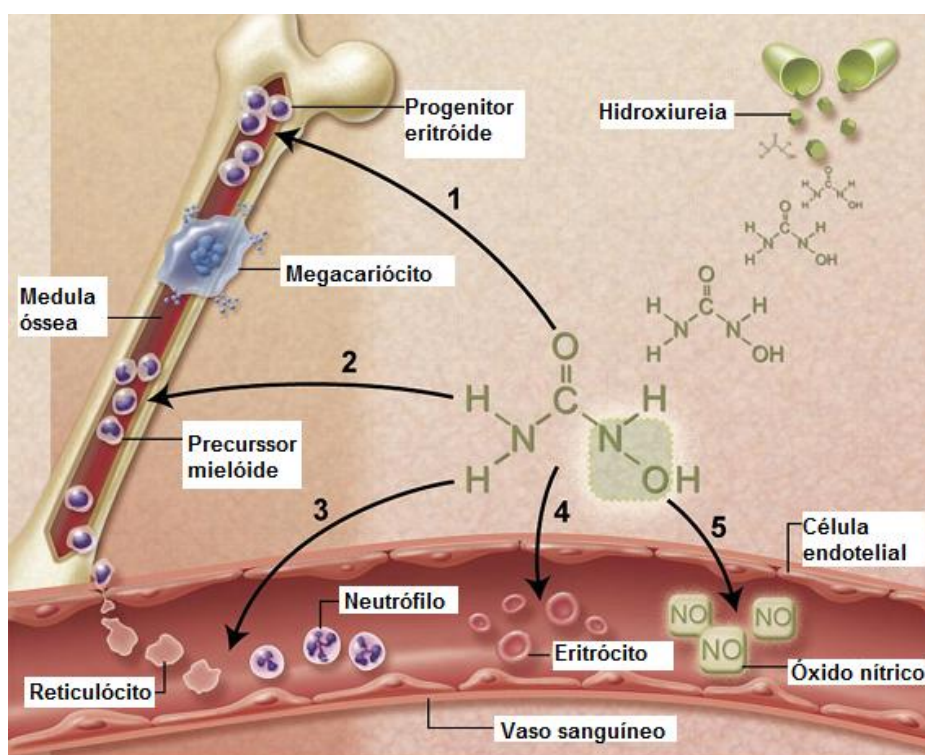


FIGURA 12 – MECANISMOS DE AÇÃO ENVOLVIDOS NOS EFEITOS BENÉFICOS DA HIDROXIUREIA NA DOENÇA FALCIFORME

NOTA: (1) - Indução de hemoglobina fetal em compartimento eritróide; (2) - Citotoxicidade da medula óssea e diminuição do número de neutrófilos e reticulócitos; (3) - Expressão alterada de moléculas de adesão em neutrófilos e reticulócitos circulantes com diminuição da adesividade e dano endotelial subsequente; (4) - Macrocitose com aumento da hidratação e redução da hemólise e da falcização intracelular; (5) - Liberação local de óxido nítrico, resultando na vasodilatação.

FONTE: MCGANN e WARE (2011)

Clinicamente, a hidroxiureia previne a vasoconstrição e diminui os processos de vaso-oclusão e isquemia. Houve reduções significativas dos episódios de dor, síndrome torácica aguda, AVC, disfunção hepática, necrose femural, úlceras de perna, frequências de hospitalizações e transfusões sanguíneas, com preservação da função de órgãos vitais, efeito positivo sobre o crescimento e qualidade de vida dos pacientes, além de aumento da sobrevida em geral (HANKINS *et al.*, 2005; HEENEY e WARE, 2008; SEGAL *et al.*, 2008; THORNBURG *et al.*, 2009; LOBO *et al.*, 2010; STEINBERG *et al.*, 2010; THOMPSON *et al.*, 2010; VOSKARIDOU *et al.*, 2010; MCGANN e WARE, 2011; BELINI JUNIOR *et al.*, 2012; COLELLA *et al.*, 2012).

O mecanismo pelo qual a hidroxiureia produz seus efeitos ainda não está completamente elucidado. Acredita-se que o principal responsável pelos efeitos benéficos seja a inativação da ribonucleotídeo redutase e consequente inibição da síntese de DNA. A parada do ciclo celular permite que os genes da  $\gamma$ -globina sejam mais ativamente expressos, estimulando diretamente a produção de HbF (SEGAL *et al.*, 2008; VOSKARIDOU *et al.*, 2010). No entanto, uma redução na adesão intercelular e na resposta inflamatória, além da produção de óxido nítrico parecem estar envolvidos na mediação da resposta clínica pelo medicamento (Figura 13) (COVAS *et al.*, 2004; ALMEIDA *et al.*, 2012; GREEN e BARRAL, 2014). Além disso, Davies *et al.* (2009) propuseram que a hidroxiureia gera ERO no citoplasma da célula, em resposta a um estresse na membrana (NAKAYASHIKI e MORI, 2013).

Em adição a este efeito citotóxico, há uma atividade genotóxica, gerada pela interrupção da síntese de DNA, descrita em modelos de cultura celular e animal. No entanto, há conflito em estudos sobre sua potencial mutagenicidade em seres humanos expostos, não tendo sido observados estes efeitos após vários anos de tratamento em crianças (FLANAGAN *et al.*, 2010).

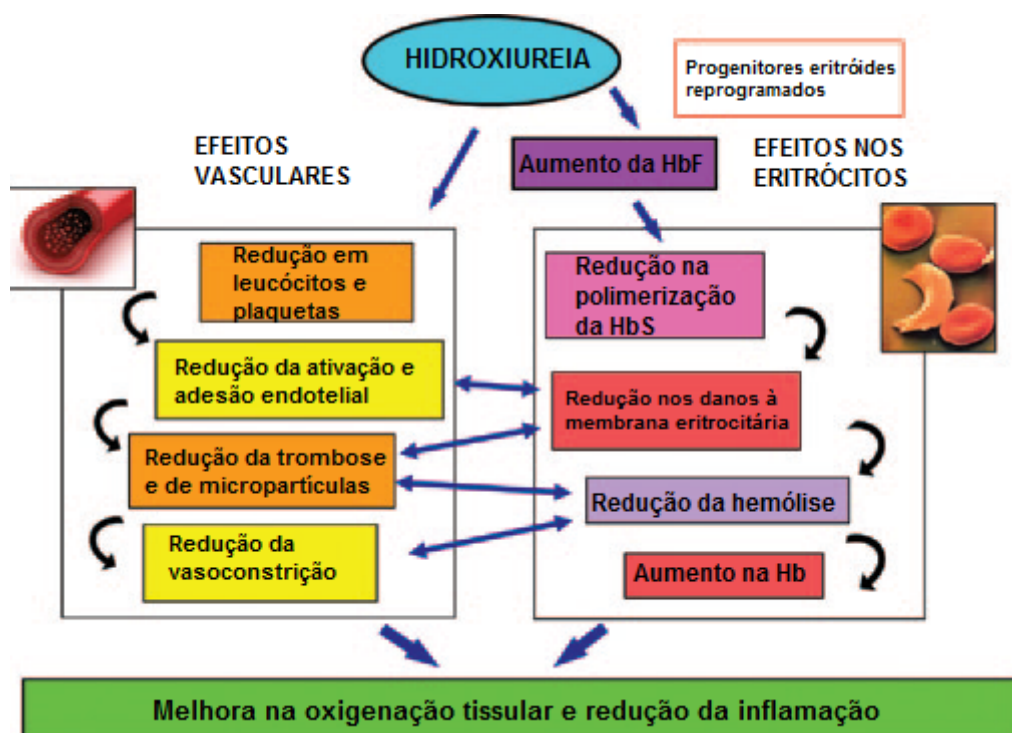


FIGURA 13 - EFEITOS FISIOLÓGICOS DA HIDROXIUREIA NA DOENÇA FALCIFORME  
 FONTE: GREEN e BARRAL, 2014

A hidroxiureia é administrada por via oral e rapidamente absorvida, apresenta excelente biodisponibilidade e o pico dos níveis plasmáticos é atingido em 1 a 4 horas. A distribuição é rápida e ampla, até 60% da dose sofre conversão por vias metabólicas e a excreção é provavelmente renal (SEGAL *et al.*, 2008). Estimam-se poucos efeitos adversos imediatos e toxicidades hematológicas previsíveis, transitórias e reversíveis (HEENEY e WARE, 2008; VOSKARIDOU *et al.*, 2010).

Os efeitos adversos da hidroxiureia são descritos como mínimos em adultos e crianças, sendo leve desconforto gastrointestinal, efeitos ocasionais na pele, mielossupressão transitória e reversível, neutropenia leve, trombocitopenia, reticulocitopenia e raramente toxicidade hepática ou renal. Não foram observados efeitos teratogênicos ou sobre a esterilidade, danos moleculares ou celulares, no crescimento ou desenvolvimento das crianças, sem evidências de mielodisplasia, malignidade ou risco aumentado de câncer (CHARACHE *et al.*, 1995; HEENEY e WARE, 2008; STEINBERG *et al.*, 2010; VOSKARIDOU *et al.*, 2010; MCGANN e WARE, 2011).

A dose inicial do medicamento na DF é de 15mg/kg/dia, podendo ser aumentada até a dose máxima tolerável de 35mg/kg/dia (SEGAL *et al.*, 2008).

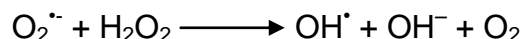
A maioria das crianças tolera dose única inicial de 20 a 30 mg/kg/dia (KINNEY *et al.*, 1999). Para pacientes intolerantes às cápsulas, Hankins *et al.* (2005) analisaram uma formulação líquida e observaram boa adesão ao tratamento, eficácia hematológica e, em geral, toxicidade limitada (HEENEY e WARE, 2008; STROUSE e HEENEY, 2012).

Atualmente, ainda não há aprovação do FDA para uso da hidroxiureia em crianças com DF. No entanto, múltiplos estudos realizados em pacientes pediátricos, bem como a experiência clínica de quase 30 anos, destacam seu efeito benéfico com sobrevida quase 20% maior para os pacientes em tratamento (VOSKARIDOU *et al.*, 2010; MCGANN e WARE, 2011; STROUSE e HEENEY, 2012; BRASIL, 2013). Sendo assim, pela portaria número 27 de 12 junho de 2013, foi aprovado o uso da hidroxiureia em crianças com DF no SUS, com a incorporação da apresentação de 100 mg. O fármaco é indicado a partir de dois anos de idade, em dose inicial de 15 mg/kg/dia, uma vez ao dia, com monitoramento da contagem de leucócitos e de plaquetas (BRASIL, 2013). Acredita-se que o aumento do uso de hidroxiureia em idade precoce pode diminuir a incidência das síndromes no futuro. (LOBO *et al.*, 2014).

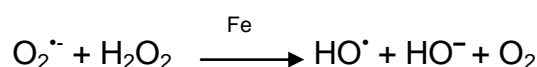
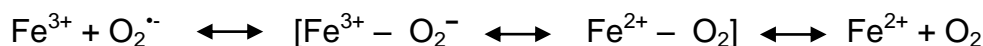
## 2.2 ESTRESSE OXIDATIVO

De acordo com a definição clássica, estresse oxidativo significa o distúrbio do balanço pró-oxidante/antioxidante, em favor da oxidação (DOMANSKI *et al.*, 2005; BENDOVA *et al.*, 2010; NUR *et al.*, 2011). A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica, e a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), como os radicais ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) e hidroxila ( $HO^{\cdot}$ ), ocorre no metabolismo humano normal, em diversas condições fisiológicas (CHAUDHURI *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2013).

O  $O_2^{\cdot-}$  participa de processos químicos importantes no contexto biológico, como a produção do  $OH^{\cdot}$  por meio da redução de quelatos de ferro, este é o radical mais deletério ao organismo, com curta meia-vida e dificilmente sequestrado, *in vivo*. Este radical pode ser formado por reação do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) com o ferro, altamente biodisponível, ou por reação do próprio  $O_2^{\cdot-}$  com o  $H_2O_2$ , pela reação de Fenton (BARREIROS *et al.*, 2006; ZWIETEN *et al.*, 2014).



O aumento do ferro livre pode iniciar danos por radicais livres através da reação de Haber-Weiss:



No entanto, quando a produção de ERO é exacerbada, danos potenciais podem ocorrer em proteínas, enzimas, carboidratos, lipídeos e DNA, causando efeitos profundos em lipoproteínas, metabolismo, função celular e transcrição (BARREIROS *et al.*, 2006; VASCONCELOS *et al.*, 2007; GIZI *et al.*, 2011).

Os eritrócitos têm sido amplamente utilizados como modelo para a investigação de estresse oxidativo, porque estão continuamente expostos a altas concentrações de oxigênio, ferro e ERO; não possuem aparatos para síntese de proteínas e não são capazes de substituir componentes danificados; os lipídeos da membrana são vulneráveis à peroxidação e contém várias substâncias antioxidantes (DOMANSKI *et al.*, 2005; VASCONCELOS *et al.*, 2007; ADESANOYE *et al.*, 2012).

A peroxidação lipídica mediada por ERO constitui o principal mecanismo de destruição da membrana e de danos celulares nos eritrócitos, podendo levar à hemólise (ADESANOYE *et al.*, 2012; FATIMA *et al.*, 2013; MUTHIAH *et al.*, 2013). Esta decomposição gera produtos intermediários prejudiciais à deformabilidade, fluidez, permeabilidade, integridade estrutural e funcional da célula (GIZI *et al.*, 2011). A hemoglobina pode representar uma fonte adicional da geração de ERO nos eritrócitos (SILVA *et al.*, 2013), devido à sua auto-oxidação, que ocorre gradualmente da forma totalmente reduzida para a totalmente oxidada (ZWIETEN *et al.*, 2014).

Quando o oxigênio é adicionado à molécula de hemoglobina, um dos elétrons do ferro é parcialmente transferido para ele (TELEN e KAUFMAN,

2004). Quando o oxigênio é abandonado, ocorre dissociação em hemoglobina parcialmente desoxigenada ( $\text{Fe}^{2+}$ ) e oxigênio molecular. Em vez de  $\text{O}_2$ , uma molécula de  $\text{O}_2^-$  pode se dissociar, oxidando o ferro e produzindo meta-hemoglobina ( $\text{Fe}^{3+}$ ) (GIZI *et al.*, 2011). A formação de meta-hemoglobina, *in vivo*, também pode ocorrer por exposição ao superóxido ou por reação direta da hemoglobina liberada dos eritrócitos com o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (ADESANOYE *et al.*, 2012).

Conforme a desnaturação oxidativa continua, a meta-hemoglobina é convertida em hemicromos, complexos não reduzidos pela meta-hemoglobina redutase. Precipitados de hemicromos e globina livre ligam-se à membrana celular e encurtam a sobrevivência dos eritrócitos (TELEN e KAUFMAN, 2004). Existe uma taxa normal de formação de meta-hemoglobina nos eritrócitos, de 0,5 a 3,0% ao dia, mas esta é incapaz de ligar-se ao oxigênio porque o ferro está no estado férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) (GIZI *et al.*, 2011). Sendo assim, os danos sofridos pelos eritrócitos decorridos do estresse oxidativo geralmente ocorrem por oxidação da hemoglobina ou pelo ataque das ERO aos componentes lipídicos da membrana. Além disso, o heme, que é extremamente lipofílico e prontamente se dissocia da meta-hemoglobina, pode se intercalar na membrana, iniciando processos oxidativos (HANSON *et al.*, 2011; LÓPEZ-REVUELTA *et al.*, 2006).

A degradação do heme dentro da célula estimula reparação e remoção por macrófagos do baço, com lesão vascular por meio de adesão a células endoteliais e sucessiva hemólise. Essas ações de estresse oxidativo estão entre as principais causas do envelhecimento celular (ZWIETEN *et al.*, 2014). O estresse oxidativo tem sido implicado na patogênese de várias doenças graves (CHAUDHURI *et al.*, 2007), como AVC, aterosclerose, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (GIZI *et al.*, 2011), câncer (BENDOVA *et al.*, 2010) e hemoglobinopatias, especialmente a doença falciforme (GEORGE *et al.*, 2013). As macromoléculas biológicas danificadas por insulto oxidativo podem gerar produtos oxidados, que atuam como marcadores de estresse oxidativo (GIZI *et al.*, 2011). O papel potencial das ERO e dos antioxidantes na etiologia de doenças crônicas tem estimulado extensa pesquisa nesta área (FATIMA *et al.*, 2013).



### 2.2.1 Metabolismo Antioxidante do Eritrócito

Antioxidantes são compostos bioquímicos que eliminam ou suprimem a formação ou as ações das ERO. Estão presentes tanto no citoplasma quanto nas membranas das células e podem ser enzimas ou não enzimáticos, produzidos endogenamente ou absorvidos da dieta (MUTHIAH *et al.*, 2013).

Os eritrócitos mantêm uma variedade de vias metabólicas antioxidantes. Os mecanismos enzimáticos incluem meta-hemoglobina redutase, superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx), glutatona redutase (GR) e catalase (CAT) (Figura 14) (TELEN e KAUFMAN, 2004; BARREIROS *et al.*, 2006; VASCONCELOS *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2013).

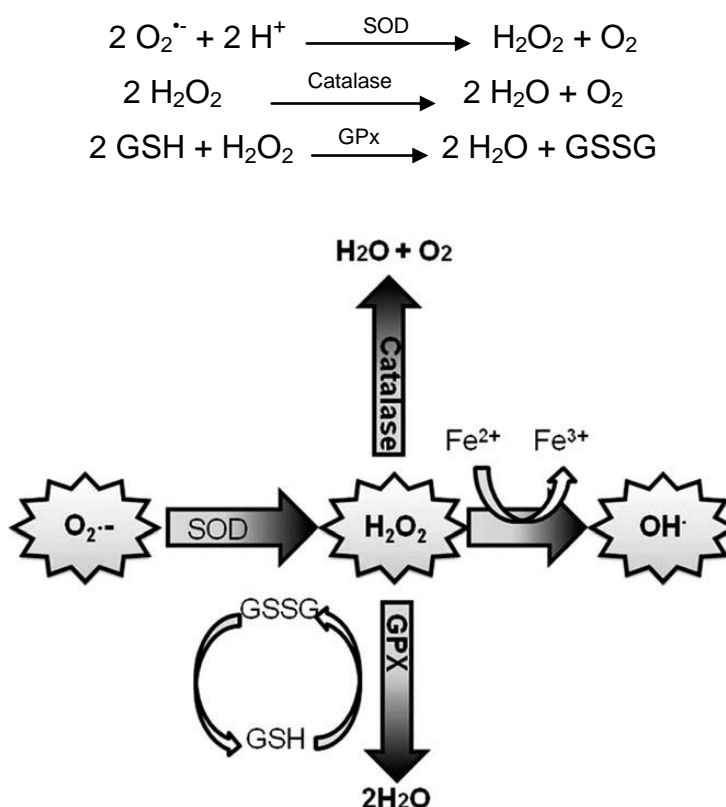


FIGURA 14 – BALANÇO ENTRE A PRODUÇÃO DE ERO E DE ANTIOXIDANTES

NOTA: GPX – glutatona peroxidase, GSH – glutatona reduzida, GSSG – glutatona oxidada,  $\text{H}_2\text{O}_2$  – peróxido de hidrogênio,  $\text{O}_2^{\cdot-}$  - ânion superóxido,  $\text{OH}^{\cdot}$  – radical hidroxila, SOD – superóxido dismutase

FONTE: CHIRICO e PIALOUX, 2012

A GR catalisa a formação de glutatona reduzida (GSH) a partir de glutatona oxidada (GSSG), com oxidação de NADPH. A SOD converte radicais superóxido em  $\text{H}_2\text{O}_2$ , que é removido pela catalase (ZWIETEN *et al.*, 2014). As

enzimas antioxidantes fornecem a primeira linha de defesa celular e reagem diretamente com as ERO (GIZI *et al.*, 2011). Os antioxidantes não enzimáticos incluem compostos de baixo peso molecular como a GSH e as vitaminas C e E (FATIMA *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2013; ZWIETEN *et al.*, 2014).

A GSH, um tripeptídeo (*L*- $\gamma$ -glutamil-*L*-cisteinilglicina) presente em concentrações elevadas no eritrócito, é cofator da família de enzimas glutathione peroxidase e um tampão redox sulfidrílico, que atua na manutenção de proteínas e peróxidos no estado reduzido, desintoxica baixos níveis de  $H_2O_2$ , elimina ERO e ajuda a manter a integridade da célula (ZWIETEN *et al.*, 2014). As alterações do sistema da glutathione têm sido consideradas indicadores úteis do estado de estresse oxidativo em humanos (GIZI *et al.*, 2011), pois eritrócitos deficientes em GSH estão mais predispostos à destruição oxidativa e têm sobrevida diminuída (ROPER *et al.*, 2006; VASCONCELOS *et al.*, 2007).

Para manter altas concentrações de GSH nos eritrócitos é crucial uma geração contínua de NADPH, que somente ocorre na via das pentoses fosfato, reação catalisada pela glucose-6-fosfato desidrogenase (G6-PD). A G6-PD e o NADPH também são fatores chave para a proteção dos eritrócitos (URSINI *et al.*, 1997; FARHUD e YAZDANPANA, 2008) e a deficiência de G6-PD tem sido associada ao aumento do estresse oxidativo, prejudicando funções importantes dos eritrócitos pela falta de proteção contra ERO (SILVA *et al.*, 2013; ZWIETEN *et al.*, 2014).

Apesar de todos os mecanismos de proteção que a célula apresenta, sob circunstâncias de estresse oxidativo crônico, as defesas antioxidantes eritrocitárias podem estar sobrecarregadas e a hemoglobina torna-se não funcional, podendo ocorrer hemólise e anemia (CLARO *et al.*, 2006). À hemólise progressiva segue-se aumento na concentração de produtos secundários da peroxidação lipídica, formação espontânea de meta-hemoglobina e geração de ERO (JÓZWIK *et al.*, 1997).

O estresse oxidativo pode ocorrer se o eritrócito for exposto a compostos oxidantes ou toxinas, se os mecanismos intrínsecos de proteção estiverem defeituosos, por doenças infecciosas ou degenerativas ou por anomalias genéticas na molécula de hemoglobina, que a tornam mais instável (TELEN e KAUFMAN, 2004; LÓPEZ-REVUELTA *et al.* 2006; ZWIETEN *et al.*, 2014).

### 2.3 ESTRESSE OXIDATIVO NA DOENÇA FALCIFORME

Os processos de estresse oxidativo têm sido cada vez mais relacionados com a fisiopatologia da DF, induzindo danos a várias células e tecidos (REES e GIBSON, 2011; GEORGE *et al.*, 2013).

O aumento da produção de pró-oxidantes é causado por mecanismos intrínsecos da doença como a auto-oxidação da HbS, transporte anormal de cátions, aumento da atividade de oxidases, liberação de ferro do heme, geração aumentada de ERO e diminuição dos níveis de óxido nítrico (WANG, 2004; DASGUPTA *et al.*, 2010; GIZI *et al.*, 2011; BELINI JUNIOR *et al.*, 2012; GEORGE *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2013).

Os eritrócitos contendo HbS são muito mais aderentes ao endotélio vascular, macrófagos e lipídeos, quando comparados a eritrócitos normais (GIZI *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2013). Além disso, a hemólise crônica aumenta a Hb livre no plasma, capaz de gerar espontaneamente grandes quantidades de subprodutos da peroxidação lipídica, contribuindo significativamente para o estresse oxidativo, inflamação, aumento da atividade coagulante, resposta imune e complicações clínicas (GIZI *et al.*, 2011; HANSON *et al.*, 2011; ZWIETEN *et al.*, 2014). O estresse oxidativo pode ser ainda maior durante as crises vaso-oclusivas e episódios dolorosos (TORRES *et al.*, 2012), quando também se evidencia atividade diminuída de antioxidantes (DASGUPTA *et al.*, 2010).

George *et al.* (2013) apresentaram evidências de um novo mecanismo enzimático eritrocitário para produção de ERO, mediado por fatores plasmáticos como o fator transformador de crescimento  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ) e a endotelina-1 (ET-1) no estímulo da atividade da NADPH oxidase nos eritrócitos. Os derivados da NADPH oxidase podem causar danos oxidativos diretos a várias estruturas subcelulares reduzindo a deformabilidade dos eritrócitos e resultando em aumento da fragilidade e hemólise. Além disso, a atividade da NADPH oxidase pode esgotar os estoques de NADPH, prejudicando a capacidade antioxidante dos eritrócitos. Além de induzir danos endógenos, as ERO derivadas dos eritrócitos, podem sair da célula através do canal aniônico da membrana e contribuir para o estresse oxidativo sistêmico, modificando a atividade de proteínas, leucócitos, plaquetas e células endoteliais (Figura 15).

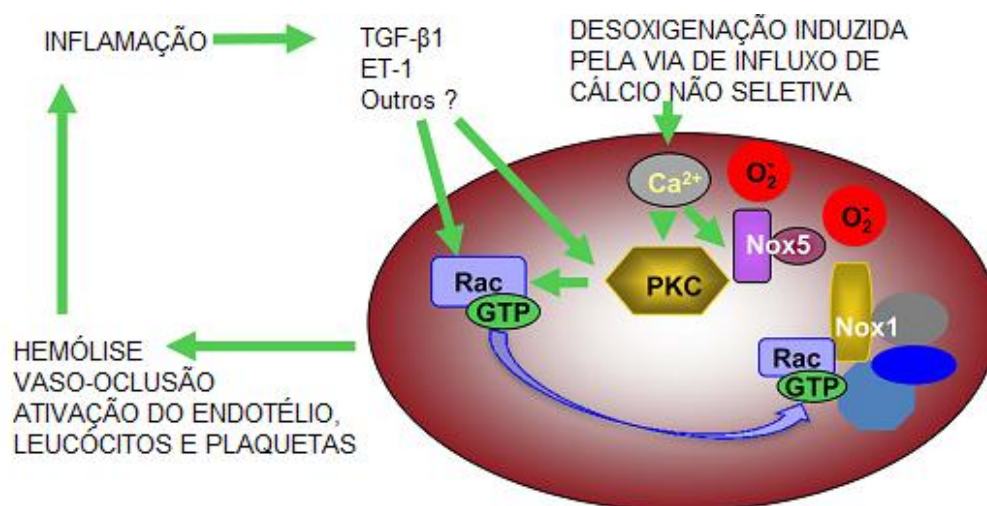


FIGURA 15 - MODELO PROPOSTO PARA A PARTICIPAÇÃO DE ERO DERIVADOS DE ERITRÓCITOS NA FISIOPATOLOGIA DA DF  
 FONTE: GEORGE *et al.* (2013)

Hanson *et al.* (2011) demonstraram a presença de meta-hemalbumina (methSA) no plasma de pacientes com DF, formada pela transferência da porção heme da meta-hemoglobina para a albumina, devido à diminuição da haptoglobina. A MetHSA também pode contribuir para o ambiente pró-oxidante.

Como as defesas antioxidantes estão diminuídas na DF, o estresse oxidativo crônico é um fator crítico para a disfunção endotelial e danos a múltiplos órgãos. Desta forma, a avaliação de produtos secundários do estresse oxidativo pode indicar biomarcadores de gravidade da doença, proporcionar informações sobre o uso de medicamentos e conduzir a novas estratégias nestes pacientes (NUR *et al.*, 2011; REES e GIBSON, 2011; BELINI JUNIOR *et al.*, 2012; TORRES *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2013).

Em estudos recentes têm-se demonstrado que a utilização da hidroxureia pode reduzir vários biomarcadores de estresse oxidativo, como os níveis de peroxidação lipídica, a produção de ERO e marcadores de inflamação aguda e crônica, além de aumentar os níveis de GSH, a biodisponibilidade do óxido nítrico e a atividade de enzimas antioxidantes. Assim, a administração da hidroxureia pode ter grande impacto sobre o estresse oxidativo total na DF (MAGALHÃES, 2011; BELINI JUNIOR *et al.*, 2012; TORRES *et al.*, 2012; GEORGE *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2013). O estudo do efeito da hidroxureia no tratamento de pacientes com DF é importante para esclarecer a sua efetividade e tem mostrado bons resultados (ASLAN e FREEMAN, 2007; FELIX

*et al.*, 2010; SIMÕES *et al.*, 2010; BELINI JUNIOR *et al.*, 2012; GREEN e BARRAL, 2014).

Visto que houve a aprovação do uso da hidroxiureia para pacientes pediátricos com DF, e que os protocolos mais recentes consideram o uso da medicação em idade cada vez mais precoce, este trabalho justifica-se pela necessidade de mais resultados de biomarcadores de estresse oxidativo em crianças, com a possibilidade de investigar, *in vivo*, a influência da hidroxiureia no metabolismo oxidativo eritrocitário e seu possível efeito antioxidante, proporcionando melhora na qualidade de vida dos pacientes tratados.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar parâmetros laboratoriais relacionados ao estresse oxidativo em crianças com doença falciforme antes e durante o tratamento com hidroxiureia.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar os parâmetros laboratoriais relacionados ao estresse oxidativo em eritrócitos, em relação ao tratamento com hidroxiureia;
- Avaliar os parâmetros laboratoriais, pela análise dos prontuários, com relação ao tratamento com a hidroxiureia;
- Correlacionar os parâmetros de estresse oxidativo com os haplótipos da  $\beta$ -globina;
- Indicar parâmetros laboratoriais de estresse oxidativo que possam ser utilizados no acompanhamento de pacientes com doença falciforme.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL

#### 4.1.1 Reagentes

Foram utilizados os reagentes *tert*-butilhidroperóxido (*t*BHP), dicloridrato de 2,2'-azobis-(2-metilpropanoamidina) (AAPH), ácido metafosfórico, ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzóico) (reagente DTNB),  $\beta$ -mercaptoetanol e pirogallol, obtidos da SIGMA-ALDRICH (Saint Louis, Estados Unidos); NaCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KCl, saponina, ácido tricloroacético, ácido tiobarbitúrico e NaOH, da VETEC (Rio de Janeiro, Brasil); citrato de sódio, tris (hidroximetil) aminometano, e álcool metílico, da MERCK (Darmstadt, Alemanha); álcool etílico, da ISOFAR (Rio de Janeiro, Brasil); ácido clorídrico, da QUIMIBRÁS (Rio de Janeiro, Brasil); EDTA dissódico, da QEEL (São Paulo, Brasil); e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, da SYNTH (Diadema, Brasil). Para determinação da atividade enzimática da G6-PD foi utilizado kit comercial da RANDOX (Antrim, Reino Unido).

#### 4.1.2 Critérios de Inclusão e Exclusão

O material utilizado nesta pesquisa compreendeu amostras de sangue venoso de 41 crianças diagnosticadas com doença falciforme, atendidas no Ambulatório de Hematopediatria do Hospital de Clínicas (HC) da Universidade Federal do Paraná (UFPR), e que receberam prescrição do medicamento hidroxiureia, no período de junho de 2013 a agosto de 2015. Para o grupo controle foram utilizadas amostras de sangue venoso coletadas de 280 crianças, estudantes da rede pública de ensino da região metropolitana de Curitiba, que participaram do projeto de extensão universitária “Incidência de anemias e parasitoses em crianças de escolas municipais da Cidade de Curitiba-PR” – PROEC 472-08, coletadas no período de março a novembro de 2013. Todas as amostras foram incluídas após a conscientização dos responsáveis pelos indivíduos sujeitos da pesquisa e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo I), aprovado pelo Comitê de

Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Setor de Ciências da Saúde da UFPR, em 22 de maio de 2013, sob registro CEP/SD: 1.105.810 e CAAE: 14226113.8.0000.0102 (Anexo II).

As amostras do grupo controle foram incluídas após resultado de hemograma e eletroforese de hemoglobinas (técnica quantitativa em acetato de celulose pH 8,0 - 9,0), excluindo-se amostras com qualquer alteração hematológica.

#### 4.1.3 Dados de Prontuários

Além das amostras de sangue, foram coletados dados dos prontuários dos pacientes estudados, constantes nos arquivos da Unidade de Hematopediatria do HC/UFPR. Os dados coletados dizem respeito ao acompanhamento clínico e laboratorial dos pacientes com doença falciforme incluídos no estudo, sendo data e local de nascimento, diagnóstico, queixas durante as consultas, internamentos e transfusões sanguíneas, medicamentos prescritos, além de resultados de exames laboratoriais.

### 4.2 MÉTODOS

#### 4.2.1 Coleta do Material

As amostras dos pacientes foram coletadas no Ambulatório de Hematopediatria do HC/UFPR, no período de junho de 2013 a agosto de 2015, quando os mesmos compareciam para a consulta de rotina, antes de iniciar o tratamento com hidroxiureia e nas consultas subsequentes. A pesquisadora responsável conscientizou os responsáveis pelos pacientes e os convidou a participar da pesquisa, mediante assinatura do TCLE, para disponibilizar as amostras de sangue para a realização dos testes. A partir de então, foram coletados 5 ml de sangue venoso, em anticoagulante EDTAK<sub>2</sub>, junto com a coleta das amostras para os demais exames de rotina dos pacientes.

As amostras do grupo controle, também 5 ml de sangue venoso, em anticoagulante EDTAK<sub>2</sub>, foram coletadas nas escolas, pelos alunos do Curso de Farmácia da UFPR, participantes do projeto de extensão universitária. As



crianças eram convidadas a participar do projeto, mediante assinatura do TCLE por seus responsáveis, antes da visita dos alunos.

#### 4.2.2 Isolamento dos Eritrócitos

Das amostras de sangue venoso, foram separadas alíquotas de 200 µl do sangue total para determinação da atividade da G6-PD. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3000 x g por 10 min, retirando-se o plasma e a camada de leucócitos. Os eritrócitos foram lavados três vezes com tampão fosfato salina (PBS) constituído de NaCl 137 mmol/l;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,47mol/l;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8,17 mmol/l e KCl 2,70 mmol/l, pH 7,4; ressuspensos no mesmo tampão, preparando-se suspensões com volume globular de 10 e 40%. A Figura 16 apresenta fluxograma do processamento das amostras.

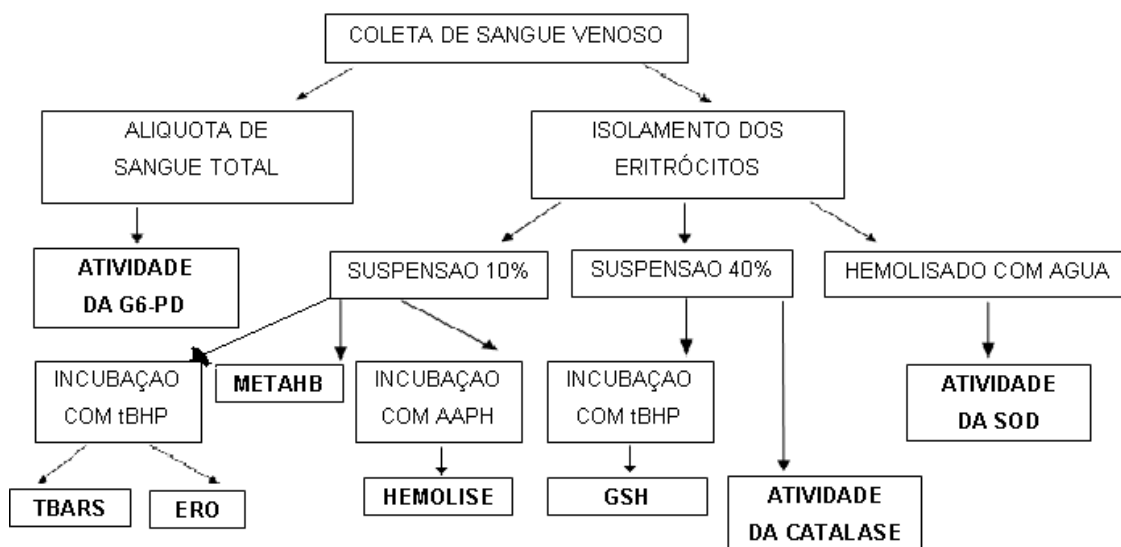


FIGURA 16 – FLUXOGRAMA DO PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS  
FONTE: O AUTOR

#### 4.2.3 Determinação da Concentração de Meta-hemoglobina

A determinação da concentração de meta-hemoglobina foi realizada segundo o método de Naoum *et al.* (2004), adaptado para pequenos volumes.

Para cada determinação, em um microtubo A, 100 µl das suspensões de eritrócitos a 10% foram hemolisados com 100 µl de solução de saponina 1%. Adicionaram-se 1000 µl de tampão fosfato 60 mmol/l, diluído a partir de uma

solução estoque de tampão fosfato 15 mmol/l ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  25 mmol/l e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  42 mmol/l). Procedeu-se à leitura da absorbância (A1) em 630nm (espectrofotômetro UV CINTRA 10), utilizando-se o tampão fosfato como branco. Em um microtubo B, 100 µl da solução do tubo A foram adicionados a 1000 µl do tampão fosfato 60 mmol/l, realizando-se a leitura da absorbância (A2) em 540nm. As dosagens foram realizadas em duplicata.

#### 4.2.3.1 Cálculo da concentração de meta-hemoglobina

Expressou-se a concentração de meta-hemoglobina como uma porcentagem em relação à concentração total de hemoglobina, de acordo com a fórmula abaixo:

$$\% \text{ MetaHb} = \frac{A1 \times 100}{A1 + (A2 \times 10)}$$

Onde:

A1 - absorbância a 630nm

A2 - absorbância a 540nm

O coeficiente 10 se deve à diluição realizada no tubo B, para obter sensibilidade técnica na leitura espectrofotométrica da oxihemoglobina em 540 nm (NAOUM *et al.*, 2004).

#### 4.2.3.2 Princípio da técnica

A proposta para a dosagem da concentração da meta-hemoglobina, em valores percentuais, se fundamenta na avaliação da solução de hemoglobina, previamente estabilizada em tampão fosfato 60 mmol/l, em dois comprimentos de onda específicos, para meta-hemoglobina (630 nm) e para oxihemoglobina (540 nm) (NAOUM *et al.*, 2004).

#### 4.2.4 Dosagem da Concentração de Glutathiona Reduzida (GSH)

Foi utilizado o método da determinação de glutathiona plasmática de Beutler *et al.* (1963), segundo a descrição de Claro *et al.* (2006), adaptado para pequenos volumes.

Foram hemolisados 50 µl das suspensões de eritrócitos a 40% com 500 µl de água deionizada. Adicionaram-se 750 µl de solução precipitante (ácido metafosfórico glacial 20 mmol/l, EDTA dissódico 0,5 mmol/l e NaCl 500 mmol/l) e a solução foi centrifugada por 10 min a 13.000 x g. Alíquotas de 500 µl do sobrenadante límpido foram adicionadas a 2000 µl de solução recém-preparada de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 300 mmol/l. A leitura espectrofotométrica da absorbância (A1) foi realizada a 412 nm (espectrofotômetro UV CINTRA 10). Em seguida, foram adicionados à mesma solução, 250 µl de ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzóico) (DTNB) 0,02 g/dl, realizando-se imediatamente nova leitura da absorbância (A2) em 412 nm. As dosagens foram realizadas em duplicata.

Para avaliação do efeito da oxidação nas concentrações de GSH, a suspensão de eritrócitos foi incubada com solução do agente oxidante tBHP durante 60 min à temperatura ambiente, sob constante homogeneização. O tBHP foi dissolvido em PBS obtendo-se 20 mmol/l, com concentração final na suspensão de 2 mmol/l. Posteriormente à incubação, a técnica foi realizada como descrito acima.

##### 4.2.4.1 Cálculo da concentração de GSH

Expressou-se a concentração de GSH em µmol/gHb de acordo com a fórmula abaixo:

$$\text{GSH} = \frac{(\text{A2} - \text{A1}) \times 101}{[\text{HB}]}$$

Onde:

A1 e A2 – absorbâncias a 412 nm

[HB] - concentração de Hb do hemolisado em g/dl

#### 4.2.4.2. Princípio da técnica

Praticamente todos os compostos não proteicos sulfidrílicos dos eritrócitos estão na forma de GSH. O DTNB é um composto dissulfeto, prontamente reduzido por compostos sulfidrílicos, formando um ânion colorido, amarelo. A redução do DTNB, representada pela densidade óptica da substância amarela, é verificada espectrofotometricamente em 412 nm, comprimento de onda relativo à absorção do produto reduzido, o ácido 5-mercapto-2-nitrobenzóico (TNB) (Figura 17), ou sais correspondentes (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

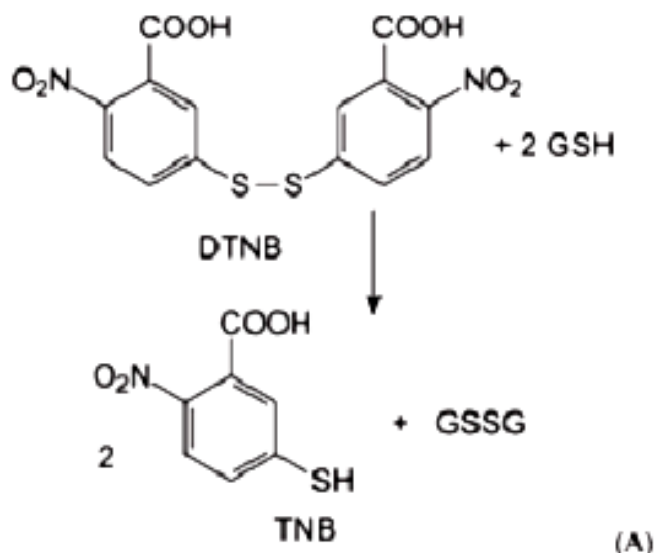


FIGURA 17 – REAÇÃO PARA DETECÇÃO DA GLUTATIONA

NOTA: (A) Reação enzimática do DTNB e do produto de sua redução, TNB, sob ação de GSH, observado em  $\lambda$  412 nm.

FONTE: VASCONCELOS *et al.* (2007)

#### 4.2.5 Dosagem das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

A determinação das TBARS foi realizada segundo método descrito por Cesquini *et al.*, (2003), adaptado para pequenos volumes.

Foram preparadas alíquotas de 600  $\mu$ l da suspensão de eritrócitos a 10%, às quais foram adicionados 250  $\mu$ l de ácido tricloroacético a 25 g/dl, centrifugando-se por 5 min a 3000 x g. Alíquotas de 600  $\mu$ l do sobrenadante foram adicionadas a 600  $\mu$ l de ácido tiobarbitúrico a 1 g/dl em NaOH 50 mmol/l. A reação foi aquecida a 100°C (estufa ODONTOBRÁS) durante 15 min e, em

seguida, resfriada em banho de gelo por mais 5 min. A absorbância foi lida em 532 nm (espectrofotômetro UV CINTRA 10).

Para avaliação do efeito da oxidação nas concentrações de TBARS, a suspensão de eritrócitos foi incubada com solução do agente oxidante tBHP durante 15 min a temperatura ambiente, sob constante homogeneização. O tBHP foi dissolvido em tampão PBS obtendo-se 60 mmol/l, com concentração final na suspensão de 2 mmol/l. Posteriormente à incubação, a técnica foi realizada como descrito acima. As dosagens foram realizadas em duplicata.

#### 4.2.5.1 Cálculo da concentração das TBARS

A concentração das TBARS foi expressa em nmol/gHb, de acordo com a fórmula abaixo:

$$\text{TBARS} = \frac{\Delta A}{1,56 \times 10^5 \times [\text{Hb}]}$$

Onde:

A – Valor da absorbância em 532 nm

$1,56 \times 10^5 \times \text{l/mmol/cm}$  - coeficiente de extinção molar

[Hb] - concentração de hemoglobina da suspensão a 10% (g/dl)

#### 4.2.5.2 Princípio da técnica

O malondialdeído (MDA) é um produto secundário da peroxidação lipídica, derivado da  $\beta$ -ruptura de endociclicização de ácidos graxos polinsaturados com mais de duas duplas ligações, tais como ácidos linoléico, araquidônico e docosaexanóico. Atualmente, o MDA pode ser usado como biomarcador geral de dano oxidativo, pois reage com o ácido tiobarbitúrico e forma um cromógeno de cor rosa fluorescente, cuja absorção ocorre em 532 nm, contra um branco apropriado. As concentrações de MDA das amostras são calculadas utilizando-se um coeficiente de extinção ( $\epsilon$ ) de  $1,56 \times 10^5 \text{ l/mmol/cm}$  (Figura 18) (CHAUDHURI *et al.*, 2007; VASCONCELOS *et al.*, 2007).

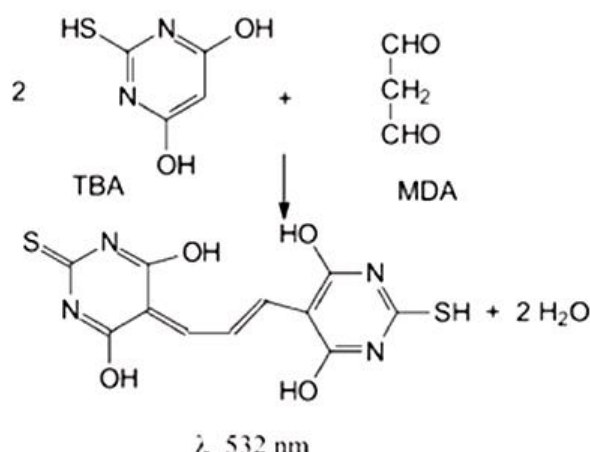


FIGURA 18 – REAÇÃO UTILIZADA PARA DETECÇÃO DE MDA EM PLASMA HUMANO  
 NOTA: O ácido tiobarbitúrico reage com o MDA e forma um cromógeno que Absorve em  $\lambda$  532 nm.  
 FONTE: VASCONCELOS *et al.* (2007)

#### 4.2.6 Determinação da Atividade Enzimática da G6-PD

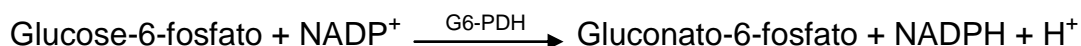
A determinação da atividade enzimática da G6-PD foi realizada com dosagem automatizada, em equipamento Cobas Mira (ROCHE), utilizando-se kit comercial (RANDOX, PD410). Alíquotas de 200  $\mu$ l de sangue total foram lavados três vezes com 2000  $\mu$ l de PBS, por centrifugações a 3000 x g durante 5 min. Em seguida, os eritrócitos foram ressuspensos em 500  $\mu$ l de solução R4 (digitonina 0,2 g/l) e incubados por 15 min a 4°C. O hemolisado resultante foi centrifugado novamente a 3000 x g por 5 min e o sobrenadante, utilizado para dosagem. No equipamento, foram utilizados 15  $\mu$ l do hemolisado, adicionados a 1000  $\mu$ l da solução R1 (EDTA 3,2 mmol/l e trietanolamina 31,7 mmol/l, pH 7,6) e 30  $\mu$ l da solução R2 (NADP 0,34 mmol/l). Após 5 min de incubação a 37°C, foram adicionados 15  $\mu$ l da solução R3 (substrato glucose 6-fosfato 0,58 mmol/l). As leituras espectrofotométricas de cinética enzimática foram realizadas em 340 nm. As determinações foram realizadas em duplicata.

##### 4.2.6.1 Cálculo da atividade enzimática da G6-PD

O equipamento libera o resultado em mUI de eritrócitos/ml de sangue. Para conversão em UI/gHb, o valor liberado pelo equipamento foi dividido pelo valor da hemoglobina da amostra (g/l).

#### 4.2.6.2 Princípio da técnica

Os eritrócitos dependem principalmente da glicólise anaeróbica para suas necessidades energéticas. A G6-PD catalisa a oxidação da glucose-6-fosfato (G6P) a 6-fosfogluconolactona que se hidrolisa espontânea e rapidamente a 6-fosfogluconato (6PG), com a redução simultânea de NADP a NADPH. Na conversão, o NADPH está envolvido na manutenção da integridade da membrana do eritrócito. A atividade da enzima é determinada pela taxa de variação da absorbância, em 340 nm, associada à redução do NADP<sup>+</sup> (KORNBERG *et al.*, 1955; LOHR e WALLER, 1974; MAKAREM, 1974; ROPER *et al.*, 2006).



Na segunda e consecutiva reação oxidante, onde a G6P é convertida em 6-fosfogluconolactona, com redução de mais uma molécula de NADP a NADPH, a lactona sofre descarboxilação para ribulose 5-fosfato, em uma reação catalisada por uma lactonase específica, mas que também pode ocorrer espontaneamente. Assim, a reação completa, catalisada pela G6-PD pode ser assim escrita:



A liberação de CO<sub>2</sub> força a reação para a direita, sendo a via não reversível na prática (ROPER *et al.*, 2006). Os ensaios utilizados para determinação da atividade da G6-PD medem a taxa de redução do NADP a NADPH quando um hemolisado é incubado com G6P (BEUTLER *et al.*, 1963).

#### 4.2.7 Determinação das Porcentagens de Hemólise

A determinação das porcentagens de hemólise foi realizada segundo método descrito por Banerjee *et al.* (2008), adaptado para pequenos volumes e leitura em microplacas.

Alíquotas de 200 µl da suspensão de eritrócitos a 10% foram incubadas com 200 µl de soluções 100, 200, 300 e 400 mmol/l do agente oxidante 2,2'-azobis-(2-metilpropanoamidina) (AAPH) dissolvido em PBS para concentrações finais de 50, 100, 150 e 200 mmol/l. A incubação ocorreu por 180 min à temperatura de 37°C, sob constante homogeneização (Banho-Maria Dubnoff, Nova Ética). Alíquotas de 200 µl da mesma suspensão foram incubadas com 200 µl de PBS, para determinação da porcentagem de hemólise basal.

Após a incubação, as alíquotas foram centrifugadas a 3000 x g por 5 min e a porcentagem de hemólise foi determinada por espectrofotometria, medindo-se a absorbância do sobrenadante em 540 nm (leitora de microplacas THERMO PLATE). As determinações foram realizadas em duplicata.

##### 4.2.7.1 Cálculo das porcentagens de hemólise

A hemólise relativa foi calculada proporcionalmente à hemólise provocada pela suspensão de AAPH a 200 mmol/l, considerada como 100%.

##### 4.2.7.2 Princípio da técnica

O AAPH induz hemólise pela geração de radicais aquosos peroxil, por decomposição térmica aeróbica e a extensão da hemólise é proporcional à quantidade dos radicais formados (NIKI *et al.* 1988; KONDO *et al.*, 1997).

#### 4.2.8 Determinação da Atividade Enzimática da Catalase

A determinação da atividade enzimática da catalase foi realizada segundo método descrito por Beutler (1984), adaptado para pequenos volumes. Foi preparado um hemolisado com 50 µl da suspensão de eritrócitos a 40% e 450 µl de solução hemolisante (β-mercaptoetanol 7 mmol/l e EDTA



0,27 mol/l). O hemolisado foi diluído 1:100 em tampão fosfato de potássio 0,1 mol/l com adição de 20 µl de etanol absoluto para cada mililitro de amostra.

Em cubeta de quartzo de 1 ml, 10 µl da amostra diluída foram adicionados a 990 µl da solução de reação (tampão tris-HCl 1mol/l e EDTA 5 mmol/l pH 8,5 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 mmol/l) mantida a 37°C. A atividade enzimática foi determinada espectrofotometricamente em reação cinética (espectrofotômetro Shimadzu UV-1601), em 240 nm, durante 10 min. As determinações foram realizadas em duplicata.

#### 4.2.8.1 Cálculo da atividade enzimática da catalase

O resultado é expresso em U/gHb de acordo com a fórmula abaixo:

$$\text{CAT} = \frac{10 \times \Delta A \times S}{[\text{Hb}] \times \epsilon \times V_h}$$

Onde:

ΔA– média das alterações na absorbância a cada 10 segundos em 240 nm

[Hb] – concentração de hemoglobina do hemolisado em g/dl

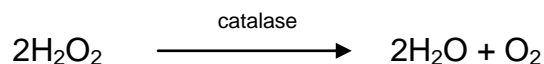
S – coeficiente de definição em grande escala (1,0 para amostras de sangue)

ε – coeficiente de extinção milimolar (0,071 para o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Vh – volume do hemolisado na reação (ml)

#### 4.2.8.2 Princípio da técnica

A enzima cataliza a quebra do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de acordo com a seguinte reação:



A taxa de decomposição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pela CAT é medida espectrofotometricamente a 240 nm, pois o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> absorve luz nesse comprimento de onda. O etanol é adicionado para estabilizar o hemolisado, porque quebra complexos interferentes formados entre a enzima e o substrato (BEUTLER, 1984). A CAT, cujo sítio ativo contém o grupo heme, está enclausurada no peroxissoma, a principal organela responsável pela

desintoxicação celular e pela oxidação de ácidos graxos de cadeia longa, fonte inesgotável de peróxidos orgânicos. Uma unidade de CAT corresponde à atividade da enzima necessária para o consumo de 1  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em 1 min (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

#### 4.2.9 Determinação da Atividade Enzimática da Superóxido Dismutase (SOD)

A determinação da atividade enzimática da SOD foi realizada segundo método descrito por Beutler (1984), adaptado para pequenos volumes e leitura em microplacas. Foi preparado um hemolisado com 200  $\mu\text{l}$  de eritrócitos lavados e 300  $\mu\text{l}$  de água deionizada gelada. Um volume de 125  $\mu\text{l}$  do hemolisado foi diluído em 875  $\mu\text{l}$  de água deionizada gelada, com adição de 250  $\mu\text{l}$  de etanol e 150  $\mu\text{l}$  de clorofórmio, com agitação a cada adição. A solução foi centrifugada por 10 min a 3000 x g.

Em microtubos, foi preparada uma curva com concentrações crescentes do extrato do hemolisado, conforme segue:

- 1- 100  $\mu\text{l}$  de tampão tris-EDTA-HCl+ 880  $\mu\text{l}$  de água
- 2- 100  $\mu\text{l}$  de tampão tris-EDTA-HCl+ 860  $\mu\text{l}$  de água + 20  $\mu\text{l}$  do extrato
- 3- 100  $\mu\text{l}$  de tampão tris-EDTA-HCl+ 840  $\mu\text{l}$  de água + 40  $\mu\text{l}$  do extrato
- 4- 100  $\mu\text{l}$  de tampão tris-EDTA-HCl+ 820  $\mu\text{l}$  de água + 60  $\mu\text{l}$  do extrato
- 5- 100  $\mu\text{l}$  de tampão tris-EDTA-HCl+ 800  $\mu\text{l}$  de água + 80  $\mu\text{l}$  do extrato
- 6- 100  $\mu\text{l}$  de tampão tris-EDTA-HCl+ 780  $\mu\text{l}$  de água + 100  $\mu\text{l}$  do extrato
- 7- 100  $\mu\text{l}$  de tampão tris-EDTA-HCl+ 580  $\mu\text{l}$  de água + 300  $\mu\text{l}$  do extrato

Os tubos foram incubados por 10 minutos a 25°C e, posteriormente foram adicionados de 20  $\mu\text{l}$  de solução de pirogalol 10 mmol/l em HCl 10 mmol/l. Em uma microplaca foram adicionados 200  $\mu\text{l}$  de cada solução e a absorbância foi lida em 412 nm, em leitora de microplacas. A absorbância do tubo contendo 300  $\mu\text{l}$  do extrato é considerada como 100% de inibição da auto-oxidação do pirogalol. As dosagens foram realizadas em duplicata.

##### 4.2.9.1 Cálculo da atividade enzimática da SOD

A atividade enzimática da SOD é expressa em U/gHb de acordo com a fórmula:

$$\text{SOD} = \frac{1,4}{0,125 \times \text{ml}_{50\%} \times 0,01 \times [\text{Hb}]} = \frac{1120}{\text{ml}_{50\%} \times [\text{Hb}]}$$

Onde:

1,4 – volume final do extrato

0,125 – volume do hemolisado no extrato

$\text{ml}_{50\%}$  – volume de extrato necessário para inibir 50% da oxidação do pirogalol

[HB] – concentração de hemoglobina do hemolisado em g/dl

#### 4.2.9.2 Princípio da técnica

A maioria das análises da atividade enzimática da SOD eritrocitária (Cu/Zn SOD) é realizada indiretamente, adicionando-se aos eritrócitos uma fonte de  $\text{O}_2^-$  e um composto que seja reduzido por este. A atividade da enzima é medida a partir do grau de inibição da reação a que o eritrócito foi submetido e a inibição da formação do cromógeno é proporcional à atividade de SOD presente na amostra (VASCONCELOS, *et al.*, 2007). O pirogalol se auto-oxida rapidamente em solução aquosa, produzindo uma coloração amarelada que pode ser medida espectrofotometricamente a 412 nm. Este processo é dependente da presença de ânions superóxido. A SOD inibe a auto-oxidação do pirogalol por catalisar a quebra do superóxido e uma unidade da enzima corresponde à quantidade que produz 50% de inibição (MARKLUND e MARKLUND, 1974; BEUTLER, 1984).

#### 4.2.10 Determinação das Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)

A dosagem direta das ERO foi realizada segundo método adaptado de López-Revuelta *et al.* (2006) para leitura em microplacas. Resultados parciais da validação desta metodologia foram apresentados no Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular, em novembro de 2014 (Anexo III) e os resultados finais foram publicados durante a fase preliminar deste trabalho (HERMANN *et al.*, 2014) (Anexo IV).

Alíquotas de 995  $\mu\text{l}$  de suspensões de eritrócitos a 10% foram incubadas com 5  $\mu\text{l}$  de uma solução a 10 mol/l da sonda diacetato de

diclorodihidrofluoresceína (DCFDA), a 37°C por 30 min. Em seguida esta suspensão foi diluída 1:10 em tampão PBS. Em microplacas escuras de 96 poços para leitura de fluorescência, 37,5 µl da suspensão final foram adicionados a 162,5 µl de PBS. Para avaliação do efeito da oxidação nas concentrações de ERO, 50 µl de PBS foram substituídos por solução a 700 µmol/l do agente oxidante tBHP. Uma nova incubação foi realizada a 37°C por 15 min. Em seguida procedeu-se à leitura da fluorescência produzida (GloMax®-Multi fluorímetro para leitura de microplacas, Promega) em 530 nm de emissão e 495 nm de excitação. As dosagens foram realizadas em quadruplicata.

#### 4.2.10.1 Cálculo da quantidade de ERO

A concentração de ERO disponível nas células é obtida dividindo-se o valor de fluorescência obtido pela concentração de Hb (g/dl) da suspensão a 10% dos eritrócitos. Desta forma, os valores são expressos em Unidades de Fluorescência/gHb.

#### 4.2.10.2 Princípio da técnica

O DCFDA é um composto não fluorescente que penetra livremente na membrana das células a 37°C. Durante a incubação, o DCFDA é hidrolisado a 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH<sub>2</sub>), que estará disponível para oxidação pelas ERO (principalmente O<sub>2</sub><sup>-</sup> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no eritrócito), para produzir o composto fluorescente 2,7-diclorofluoresceína (DCF) (Figura 19). Esta fluorescência é então medida e corresponde à quantidade de ERO disponível na célula (KIM *et al.*, 2014).

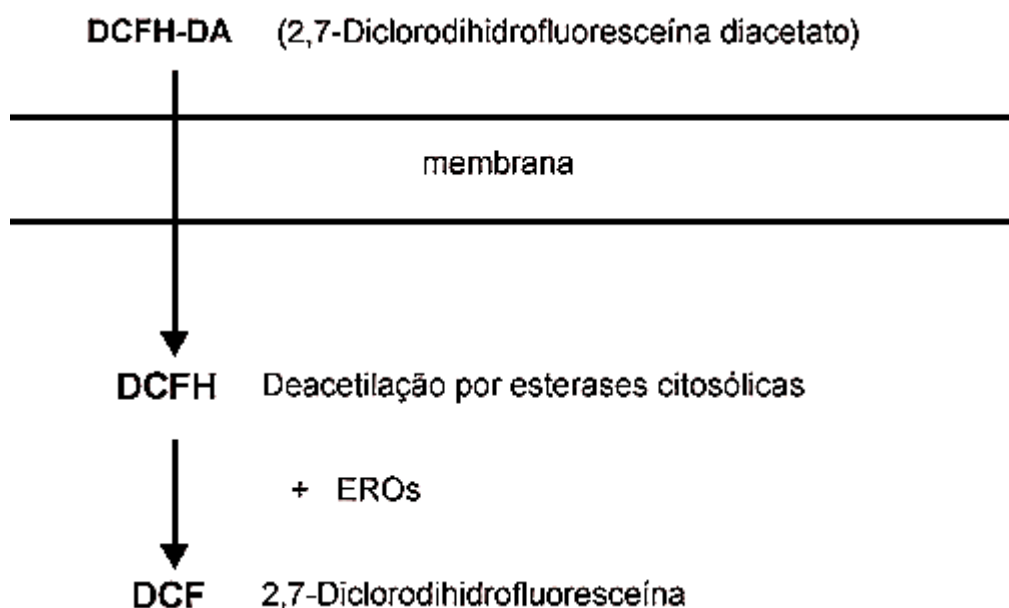


FIGURA 19 – PRÍNCÍPIO DO FUNCIONAMENTO DA SONDA DCFDA  
FONTE: SILVEIRA (2004)

#### 4.2.11 Análise Estatística dos Resultados

Os dados resultantes dos experimentos foram submetidos à análise pelo programa StatSoft STATISTICA versão 8.0. Nenhum *outlier* foi identificado e todos os dados estavam distribuídos normalmente, segundo o teste de Kolmogorov-Smirnov.

Para os resultados obtidos no grupo controle, os valores hematológicos e os valores dos parâmetros de estresse oxidativo foram expressos como mediana e intervalos interquartis. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o teste *t* de Student para comparação entre gêneros.

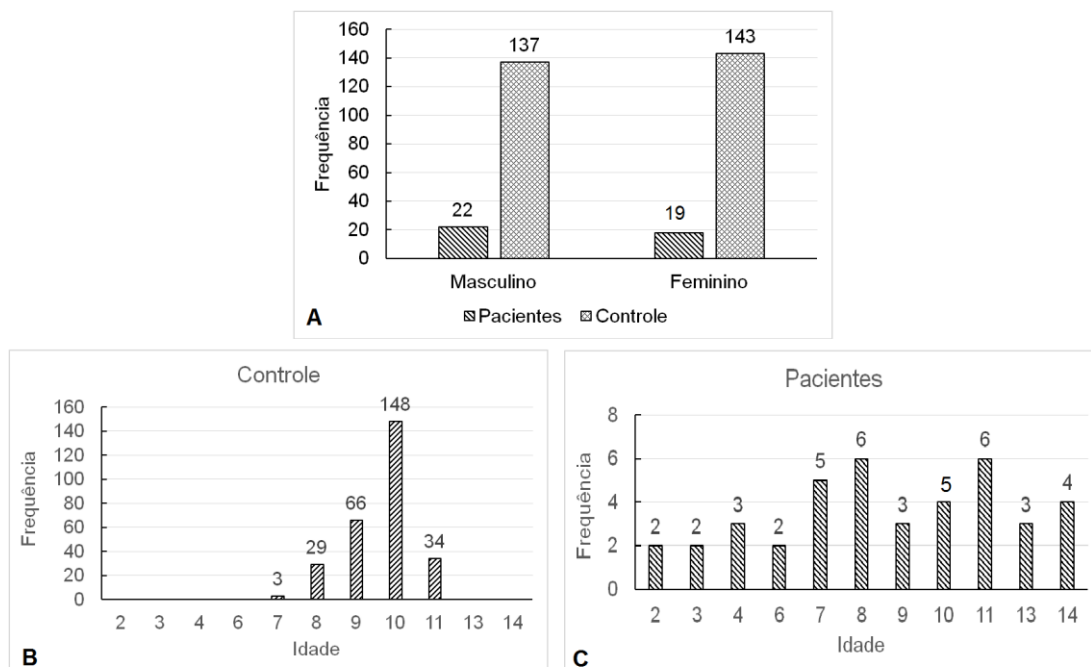
Os valores hematológicos, laboratoriais e dos parâmetros relacionados ao estresse oxidativo iniciais dos pacientes com DF foram expressos como mediana e intervalos interquartis e as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o teste *t* de Student para comparação com o grupo controle.

Os valores hematológicos e relacionados ao estresse oxidativo nos pacientes com DF durante o tratamento com hidroxureia, em comparação aos níveis iniciais foram submetidos à análise estatística de variância ANOVA, seguida do teste de Tukey para comparação de pares de médias. Em todas as análises foi considerada significância estatística para  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS

O gráfico 1 apresenta os dados de caracterização dos grupos. O grupo controle constitui-se de 280 crianças, 137 do sexo masculino e 143 do sexo feminino, com mediana de idade de 10 anos, variando de 7 a 11 anos de idade. O grupo de pacientes com doença falciforme totalizou 41 crianças, 19 do sexo masculino e 22 do sexo feminino, com mediana de idade 8 anos, variando de 2 a 14 anos de idade.



**GRÁFICO 1 – CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS CONTROLE E PACIENTES COM DF ATENDIDOS NO AMBULATÓRIO DE HEMATOPEDIATRIA DO HC/UFPR.**  
 NOTA: A – Frequência de sexo para os grupos controle e pacientes com DF atendidos no ambulatório de Hematopedatria do HC/UFPR. B - Frequência de idade para o grupo controle. C - Frequência de idade para os pacientes com DF atendidos no ambulatório de Hematopedatria do HC/UFPR

Dos 41 pacientes incluídos no estudo, 7 são naturais da cidade de Curitiba e os demais provenientes de 28 diferentes cidades do estado do Paraná. Apenas 5 pacientes não foram diagnosticados nos testes de triagem neonatal, por terem nascido antes da inclusão do diagnóstico das hemoglobinopatias ao nascimento. Para dois destes pacientes foi realizada

eletroforese de hemoglobinas por terem irmãos mais novos diagnosticados com DF pela triagem neonatal. Os outros três pacientes foram diagnosticados após internações recorrentes com necessidade de transfusões sanguíneas.

Do total de pacientes, 23 (56,1%) foram diagnosticados com anemia falciforme (HbSS), 10 pacientes (24,4%) com HbSC e os outros 8 (19,5%) com HbS associada com  $\beta$ -talassemia.

## 5.2 TRATAMENTO COM HIDROXIUREIA

Os 41 pacientes diagnosticados com DF, em acompanhamento no Ambulatório de Hematopediatria do HC/UFPR, foram incluídos no estudo quando receberam a prescrição da hidroxiureia. A adesão ao tratamento foi avaliada segundo dados dos prontuários. Foi observado que 30 pacientes seguiram efetivamente o tratamento, enquanto 11 pacientes não iniciaram o uso da hidroxiureia. As causas descritas para a não adesão foram dificuldade de obtenção do medicamento na cidade de origem (2 casos), transferência para outro centro de referência para o tratamento (2 casos), não concordância dos responsáveis com o uso do medicamento (4 casos) e motivos não informados no prontuário (3 casos).

Dos 30 pacientes que aderiram efetivamente ao tratamento, 27 receberam como protocolo terapêutico a posologia de 500 mg de hidroxiureia ao dia, enquanto 3 pacientes receberam prescrição de dosagem diária de 1000 mg, visto que a dose é determinada pelo peso da criança.

## 5.3 PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

A Tabela 1 apresenta os parâmetros hematológicos do grupo controle, separados por gênero. Diferenças estatisticamente significativas foram observadas entre os gêneros masculino e feminino para contagem de eritrócitos, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM) e hemoglobina corpuscular média (HCM) ( $p < 0,05$ ).

TABELA 1 – VALORES DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS NO GRUPO CONTROLE

	MASCULINO N = 137	CV	FEMININO N = 143	CV	p <sup>a</sup>
<b>Eritrócitos (x10<sup>6</sup>/mm<sup>3</sup>)<sup>b</sup></b>	<b>4,9 (4,6 – 5,1)</b>	<b>6,73</b>	<b>4,7 (4,5 – 4,9)</b>	<b>6,82</b>	<b>&lt;0,01</b>
Hemoglobina (g/dl)	13,5 (12,9 – 14,1)	6,56	13,4 (12,8 – 13,9)	6,70	>0,05
<b>Hematócrito (%)<sup>b</sup></b>	<b>39,7 (37,9 – 41,2)</b>	<b>7,35</b>	<b>39,0 (37,6 – 40,3)</b>	<b>6,01</b>	<b>&lt;0,05</b>
<b>VCM (fl) <sup>b</sup></b>	<b>81,5 (78,8 – 83,9)</b>	<b>4,92</b>	<b>82,9 (80,6 – 85,0)</b>	<b>4,46</b>	<b>&lt;0,05</b>
<b>HCM (pg) <sup>b</sup></b>	<b>27,8 (27,1 – 28,8)</b>	<b>5,64</b>	<b>28,5 (27,6 – 29,5)</b>	<b>5,16</b>	<b>&lt;0,01</b>
CHCM (g/dl)	34,1 (33,4 – 34,9)	3,84	34,4 (33,7 – 35,2)	3,30	>0,05
Leucócitos (x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	6,5 (5,4 – 7,5)	20,79	6,6 (5,6 – 7,6)	21,65	>0,05
Plaquetas (x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	287,0 (245,0 – 326,0)	19,06	303,0 (251,0 – 344,0)	20,46	>0,05

NOTA: Dados apresentados como mediana e intervalos interquartil.

VCM – volume corpuscular médio, HCM – hemoglobina corpuscular média, CHCM – concentração de hemoglobina corpuscular média, CV – coeficiente de variação.

<sup>a</sup> Teste *t* de Student.

<sup>b</sup> Estatisticamente significante.

A Tabela 2 apresenta os parâmetros hematológicos dos pacientes com DF, antes de iniciarem o tratamento com hidroxureia, em comparação com o grupo controle. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas para todos os parâmetros, com exceção da HCM.

TABELA 2 – PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS DOS PACIENTES COM DF ATENDIDOS NO AMBULATÓRIO DE HEMATOPEDIATRIA DO HC/UFPR EM COMPARAÇÃO COM O GRUPO CONTROLE

	GRUPO CONTROLE N = 280	CV	PACIENTES N = 41	CV	p <sup>a</sup>
<b>Eritrócitos (x10<sup>6</sup>/mm<sup>3</sup>)<sup>b</sup></b>	<b>4,8 (4,5 – 5,0)</b>	<b>7,0</b>	<b>3,2 (2,4 – 3,9)</b>	<b>29,2</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>Hemoglobina (g/dl)<sup>b</sup></b>	<b>13,5 (12,9 – 14,0)</b>	<b>6,6</b>	<b>8,9 (7,0 – 9,7)</b>	<b>21,5</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>Hematócrito (%)<sup>b</sup></b>	<b>39,0 (37,2 – 40,4)</b>	<b>6,7</b>	<b>26,7 (21,0 – 29,1)</b>	<b>20,9</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>VCM (fl)<sup>b</sup></b>	<b>82,3 (79,4 – 84,0)</b>	<b>4,8</b>	<b>86,3 (71,3 – 89,0)</b>	<b>13,7</b>	<b>&lt;0,05</b>
HCM (pg)	28,2 (27,3 – 29,3)	5,5	28,9 ± (24,0 – 33,0)	16,1	>0,05
<b>CHCM (g/dl)<sup>b</sup></b>	<b>34,3 (34,0 – 35,3)</b>	<b>3,6</b>	<b>33,5 ± (31,0 – 35,5)</b>	<b>6,2</b>	<b>&lt;0,01</b>
<b>Leucócitos (x10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>)<sup>b</sup></b>	<b>6,3 (5,5 – 7,8)</b>	<b>21,2</b>	<b>13,8 (9,1 – 16,8)</b>	<b>44,3</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>Plaquetas (x10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>)<sup>b</sup></b>	<b>291,0 (237,0 – 335,0)</b>	<b>19,9</b>	<b>458,5 (285,0 – 545,0)</b>	<b>43,4</b>	<b>&lt;0,001</b>

NOTA: Dados apresentados como mediana e intervalos interquartil.

VCM – volume corpuscular médio, HCM – hemoglobina corpuscular média, CHCM – concentração de hemoglobina corpuscular média, CV – coeficiente de variação.

<sup>a</sup> Teste *t* de Student.

<sup>b</sup> Estatisticamente significante.

Os gráficos 2, 3, 4, 5 e 6 mostram uma comparação entre os parâmetros hematológicos dos pacientes com DF durante o primeiro ano de vida, após o primeiro ano de vida, antes do início do tratamento com hidroxureia e durante o tratamento nos tempos 3 meses, 6 meses e 9 meses ou tempos maiores (variando de 9 a 24 meses, com média de 13,2 meses).



No gráfico 2 estão ilustradas as variações encontradas para contagem total de eritrócitos, dosagem de hemoglobina, hematócrito e do índice de anisocitose (RDW) nos pacientes com DF. Foi observada diferença estatisticamente significativa para os valores de hemoglobina antes do primeiro ano de vida e após 1 ano de idade dos pacientes ( $p<0,01$ ).

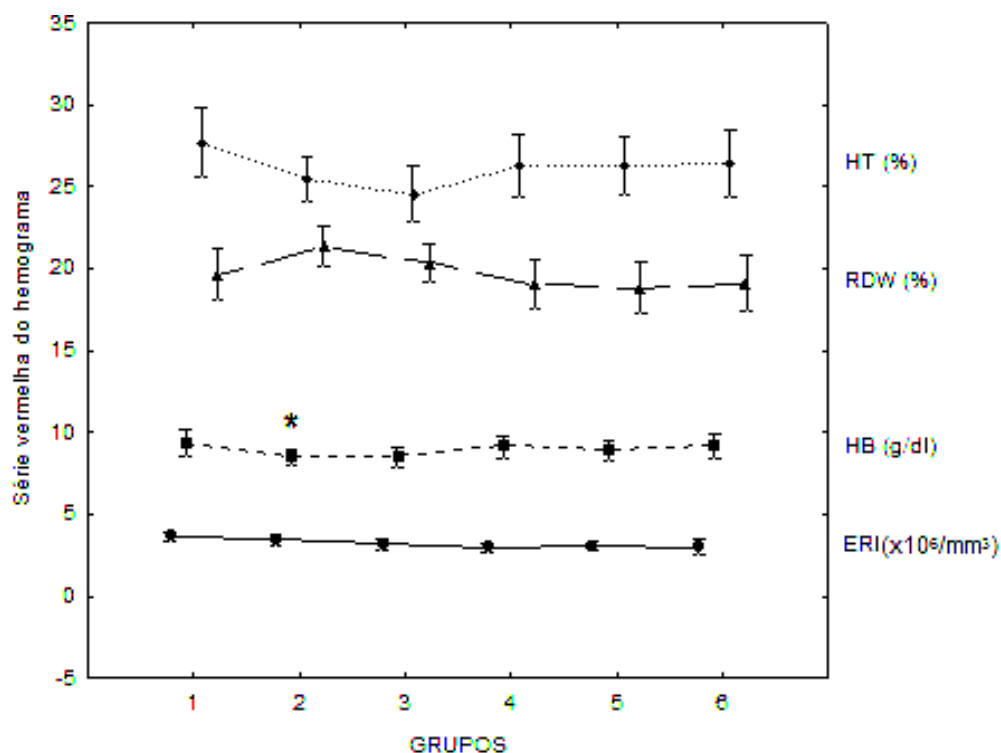


GRÁFICO 2 – VALORES MÉDIOS PARA A CONTAGEM DE ERITRÓCITOS, DOSAGEM DE HEMOGLOBINA, HEMATÓCRITO E RDW EM PACIENTES COM DF ATENDIDOS NO AMBULATÓRIO DE HEMATOPEDIATRIA DO HC/UFPR ANTES E DURANTE O TRATAMENTO COM HIDROXIUREIA, CURITIBA-PR, JUNHO DE 2013 A AGOSTO DE 2015

NOTA: ERI – eritrócitos, HB – hemoglobina, HT – hematócrito, RDW - índice de anisocitose. Grupos 1 – durante o primeiro ano de vida (n = 33), 2 – após 1 ano de idade (n = 39), 3 – antes do tratamento com hidroxiureia (n = 41), 4 – após 3 meses de tratamento (n = 27), 5 – após 6 meses de tratamento (n = 24), 6 – após mais de 9 meses de tratamento (n = 15), dentro do grupo de 41 pacientes estudados

\* - diferença estatisticamente significativa para Hb entre os grupos 1 e 2 ( $p<0,01$ ), teste de Tukey.

Para os valores de VCM (Gráfico 3), pode ser observado aumento significativo do parâmetro após o início do tratamento com hidroxiureia ( $p < 0,001$ ). O valor inicial médio de 80,0 fl passou a 90,4 fl; 90,3 fl e 90,7 fl após 3, 6 e mais de 9 meses de tratamento, respectivamente.

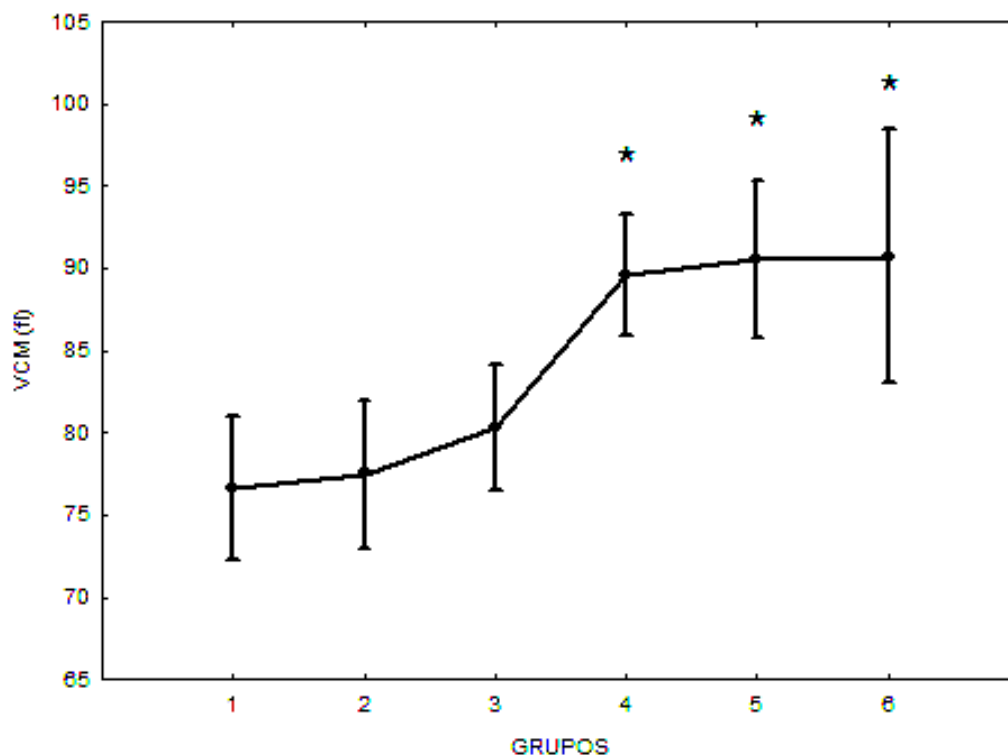


GRÁFICO 3 – VALORES MÉDIOS DE VOLUME CORPUSCULAR MÉDIO EM PACIENTES COM DF ATENDIDOS NO AMBULATÓRIO DE HEMATOPEDIATRIA DO HC/UFPR ANTES E DURANTE O TRATAMENTO COM HIDROXIUREIA, CURITIBA-PR, JUNHO DE 2013 A AGOSTO DE 2015

NOTA: VCM– volume corpuscular médio (fl). Grupos 1 – durante o primeiro ano de vida (n= 33), 2 – após 1 ano de idade (n = 39), 3 – antes do tratamento com hidroxiureia (n = 41), 4 – após 3 meses de tratamento (n = 27), 5 – após 6 meses de tratamento (n = 24), 6 – após mais de 9 meses de tratamento (n = 15), dentro do grupo de 41 pacientes estudados

\* - diferença estatisticamente significativa para VCM entres os grupos 3, 4, 5 e 6 ( $p < 0,001$ ), teste de Tukey.

No Gráfico 4 estão ilustrados os valores da contagem de leucócitos nos pacientes com DF antes e durante o tratamento com hidroxiureia. Foi observada uma redução significativa entre os valores deste parâmetro antes e depois do uso do medicamento ( $p<0,001$ ), sem diferenças significativas nas reduções após 3, 6, 9 meses ou tempos maiores de tratamento.

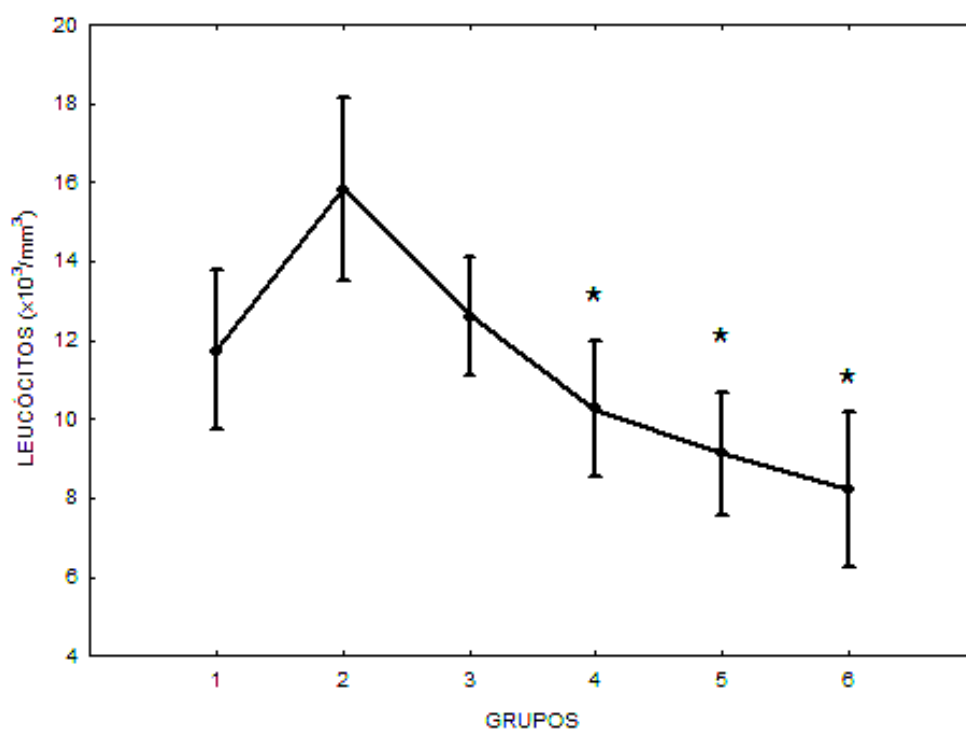


GRÁFICO 4 – VALORES MÉDIOS DAS CONTAGENS DE LEUCÓCITOS EM PACIENTES COM DF ATENDIDOS NO AMBULATÓRIO DE HEMATOPEDIATRIA DO HC/UFPR ANTES E DURANTE O TRATAMENTO COM HIDROXIUREIA, CURITIBA-PR, JUNHO DE 2013 A AGOSTO DE 2015

NOTA: Grupos 1 – durante o primeiro ano de vida ( $n = 33$ ), 2 – após 1 ano de idade ( $n = 39$ ), 3 – antes do tratamento com hidroxiureia ( $n = 41$ ), 4 – após 3 meses de tratamento ( $n = 27$ ), 5 – após 6 meses de tratamento ( $n = 24$ ), 6 – após mais de 9 meses de tratamento ( $n = 15$ ), dentro do grupo de 41 pacientes estudados

\* - diferença estatisticamente significativa para leucócitos entres os grupos 3, 4, 5 e 6 ( $p<0,001$ ), teste de Tukey.

Nos Gráficos 5 e 6 estão apresentados os valores da contagem de plaquetas e de reticulócitos nos pacientes, antes e durante o tratamento com hidroxiureia. Para ambos os parâmetros, não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores antes e depois do início da medicação.

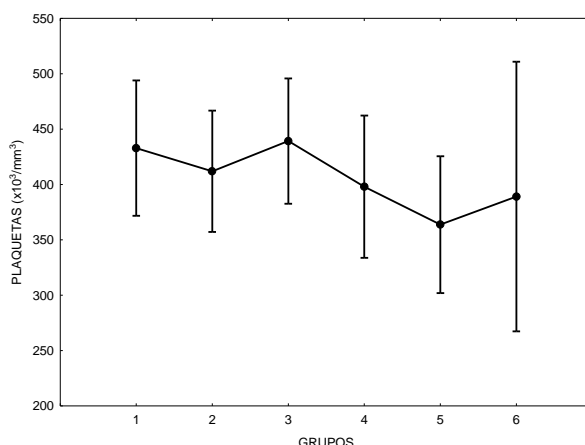


GRÁFICO 5 – VALORES MÉDIOS DAS CONTAGENS DE PLAQUETAS EM PACIENTES COM DF ATENDIDOS NO AMBULATÓRIO DE HEMATOPEDIATRIA DO HC/UFPR ANTES E DURANTE O TRATAMENTO COM HIDROXIUREIA, CURITIBA-PR, JUNHO DE 2013 A AGOSTO DE 2015

NOTA: Grupos 1 – durante o primeiro ano de idade ( $n = 33$ ), 2 – após 1 ano de idade ( $n = 39$ ), 3 – antes do tratamento com hidroxiureia ( $n = 41$ ), 4 – após 3 meses de tratamento ( $n = 27$ ), 5 – após 6 meses de tratamento ( $n = 24$ ), 6 – após mais de 9 meses de tratamento ( $n = 15$ ), dentro do grupo de 41 pacientes estudados.

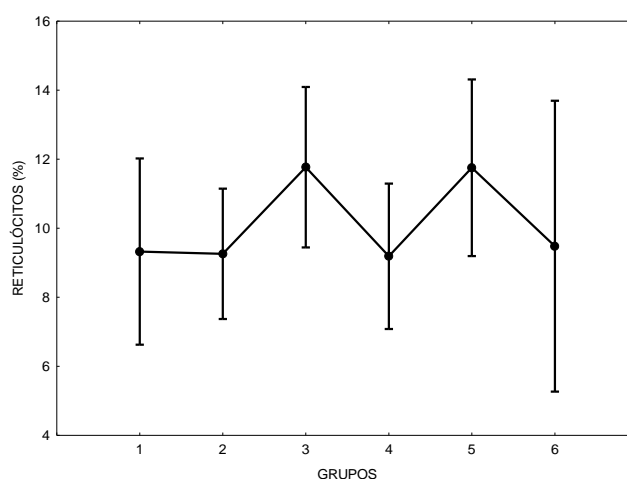


GRÁFICO 6 – VALORES MÉDIOS DAS PORCENTAGENS DE RETICULÓCITOS EM PACIENTES COM DF ATENDIDOS NO AMBULATÓRIO DE HEMATOPEDIATRIA DO HC/UFPR ANTES E DURANTE O TRATAMENTO COM HIDROXIUREIA, CURITIBA-PR, JUNHO DE 2013 A AGOSTO DE 2015

NOTA: Grupos 1 – durante o primeiro ano de vida ( $n = 33$ ), 2 – após 1 ano de idade ( $n = 39$ ), 3 – antes do tratamento com hidroxiureia ( $n = 41$ ), 4 – após 3 meses de tratamento ( $n = 27$ ), 5 – após 6 meses de tratamento ( $n = 24$ ), 6 – após mais de 9 meses de tratamento ( $n = 15$ ), dentro do grupo de 41 pacientes estudados.

O Gráfico 7 apresenta os valores de HbF dos pacientes com DF antes e durante o tratamento com hidroxiureia. Houve aumento significativo dos valores médios após o uso do medicamento ( $p < 0,05$ ).

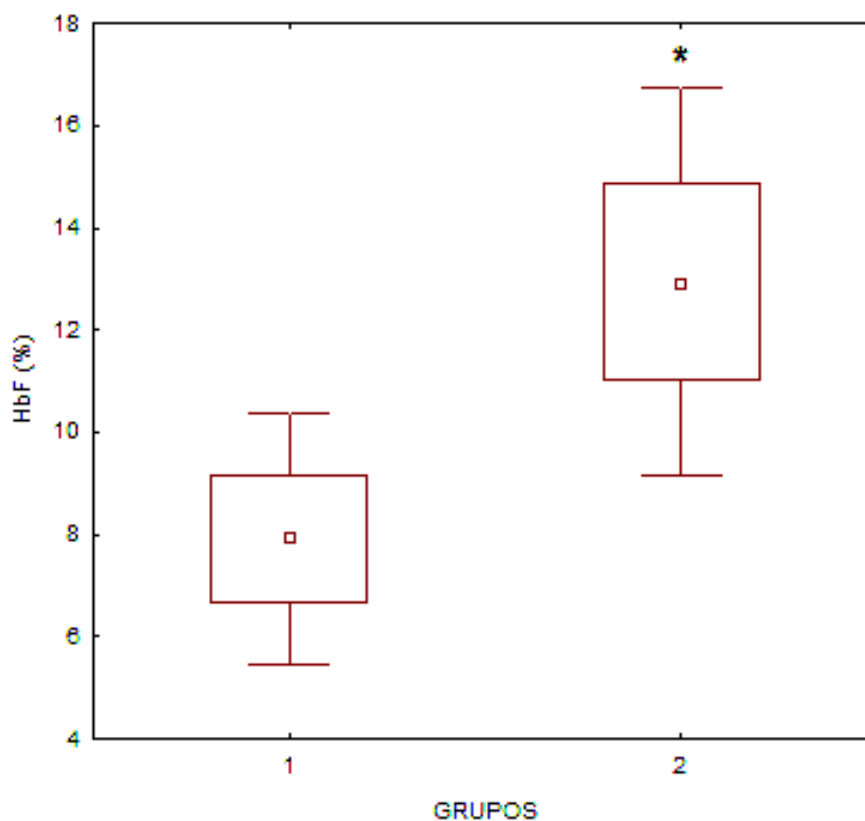


GRÁFICO 7 – VALORES DE HbF EM PACIENTES COM DF ATENDIDOS NO AMBULATÓRIO DE HEMATOPEDIATRIA DO HC/UFPR ANTES E DURANTE O TRATAMENTO COM HIDROXIUREIA, CURITIBA-PR, JUNHO DE 2013 A AGOSTO DE 2015

NOTA: Grupos 1 – antes do tratamento com hidroxiureia (n = 41), 2 – após o início do tratamento, em tempos variáveis (n = 27).

\* - diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ), teste *t* de Student.

## 5.4 PARÂMETROS LABORATORIAIS

A Tabela 3 apresenta os valores de parâmetros laboratoriais dos pacientes com DF, antes e durante o tratamento com hidroxiureia, obtidos dos prontuários dos pacientes. Comparando-se os resultados antes do início do tratamento com os valores de normalidade disponíveis na literatura (BURTIS *et al.*, 2008; BRAUNWALD *et al.*, 2013), foram observados aumentos nos níveis de bilirrubinas, aspartato aminotransferase (AST) e na lactato desidrogenase (LDH). Após o tratamento com hidroxiureia houve redução significativa nos níveis de LDH ( $p < 0,05$ ).

TABELA 3 – PARÂMETROS LABORATORIAIS EM PACIENTES COM DF ATENDIDOS NO AMBULATÓRIO DE HEMATOPEDIATRIA DO HC/UFPR ANTES E DEPOIS DO INÍCIO DO TRATAMENTO COM HIDROXIUREIA, CURITIBA-PR, JUNHO DE 2013 A AGOSTO DE 2015

	ANTES DO TRATAMENTO		APÓS O TRATAMENTO			
	N = 41		N = 23			
	MEDIANA	CV	MEDIANA	CV	VR	$p^a$
URÉIA (mg/dl)	19,0 (15,0 – 22,0)	27,8	19,0 (15,0 – 24,0)	28,9	10 - 45	>0,05
CRE (mg/dl)	0,4 (0,4 – 0,5)	14,9	0,4 (0,4 – 0,5)	15,7	0,2 - 1,5	>0,05
TBIL (mg/dl)	2,1 (1,4 - 3,2)	49,8	2,1 (1,4 – 3,2)	98,6	0,3 - 1,0	>0,05
DBIL (mg/dl)	0,5 (0,4 – 0,6)	34,9	0,5 (0,5 – 0,6)	27,7	0,1 - 0,3	>0,05
IBIL (mg/dl)	1,5 (0,9 – 2,4)	60,3	1,4 (0,9 – 2,4)	97,8	0,2 - 0,7	>0,05
AST (U/l)	41,5 (35,0 – 48,0)	20,4	38,0 (30,0 – 44,0)	27,3	0 – 35	>0,05
ALT (U/l)	16,1 (13,0 – 21,0)	84,5	15,0 (13,0 – 18,0)	28,6	0 – 35	>0,05
GLI (mg/dl)	84,0 (78,0 – 90,0)	14,5	72,0 (64,0 – 100,0)	25,0	60 - 99	>0,05
SOD (mmol/l)	137,0 (135 – 140)	2,1	137,0 (135 – 142)	2,35	136 - 145	>0,05
POT (mmol/l)	4,3 (4,0 – 4,5)	10,3	4,4 (3,7 – 4,7)	16,6	3,5 - 5,0	>0,05
ÁC UR (mg/dl)	3,9 (3,1 – 4,9)	33,7	3,3 (3,0 – 3,6)	12,8	1,5 - 8,0	>0,05
FOS (mg/dl)	4,5 (4,3 – 5,3)	15,8	4,6 (4,1 – 4,9)	8,9	3,0 - 4,5	>0,05
CAL (mg/dl)	9,4 (9,1 – 9,7)	5,5	9,7 (8,8 – 9,7)	6,8	9,0 - 10,5	>0,05
MAG (mg/dl)	2,2 (2,1 – 2,4)	131,3	2,1 (2,0 – 2,4)	9,6	1,8 - 3,0	>0,05
CLO (mmol/l)	107 (105 – 109)	2,8	107 (104 – 110)	3,9	98 - 110	>0,05
<b>LDH (U/l)<sup>b</sup></b>	<b>500,5 (441 – 716)</b>	<b>30,9</b>	<b>363,0 (272 – 407)</b>	<b>19,8</b>	<b>100 - 190</b>	<b>&lt;0,05</b>
PT (g/dl)	7,2 (6,9 – 7,8)	8,8	8,1 (7,9 – 8,3)	3,4	5,5 - 8,0	>0,05
ALB (g/dl)	4,1 (3,9 – 4,3)	11,2	4,6 (4,3 – 4,9)	9,2	3,5 - 5,5	>0,05
FER (µg/dl)	71,5 (56,0 – 86,9)	41,0	107,1 (67 – 144)	43,1	50 – 150	>0,05
FERRI (ng/ml)	221,0 (135 – 439)	122,4	226,5 (115 – 418)	95,8	10 - 400	>0,05

NOTA: Dados apresentados como mediana e intervalos interquartil.

URE – ureia, CRE – creatinina, TBIL – bilirrubina total, DBIL – bilirrubina direta, IBIL – bilirrubina indireta, AST – aspartato aminotransferase, ALT – alanina aminotransferase, GLI – glucose, SOD – sódio, POT – potássio, ÁC UR – ácido úrico, FOS – fósforo, CAL – cálcio, MAG – magnésio, CLO – cloro, LDH – lactato desidrogenase, PT – proteínas totais, ALB – albumina, FER – ferro, FERRI – ferritina, CV – coeficiente de variação, VR – valores de referência (BURTIS *et al.*, 2008; BRAUNWALD *et al.*, 2013).

<sup>a</sup> Teste *t* de Student.

<sup>b</sup> Estatisticamente significante.

## 5.5 PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO

Na Tabela 4 estão apresentados os resultados dos parâmetros relacionados ao estresse oxidativo no grupo controle, separados por gênero. Diferenças estatisticamente significantes foram observadas somente para percentagem de hemólise com a adição de solução de 50 mmol/l de AAPH ( $p < 0,05$ ).

TABELA 4 – PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO NO GRUPO CONTROLE

	MASCULINO N = 48	CV	FEMININO N = 52	CV	$p^a$
META (%)	2,3 (2,1–2,5)	15,3	2,2 (1,9–2,4)	17,3	>0,05
GSH ( $\mu\text{mol/gHb}$ )	5,9 (4,9–7,5)	24,5	6,5 (5,4–7,4)	18,7	>0,05
TBARS ( $\eta\text{mol/gHb}$ )	23,8 (19,9–29,3)	22,6	23,5 (20,2–30,6)	24,7	>0,05
HEMO 0 (%)	1,0 (0,8–1,2)	35,7	1,2 (0,8–1,6)	40,5	>0,05
<b>HEMO 50 (%)<sup>b</sup></b>	<b>27,9 (20,1–34,4)</b>	<b>29,1</b>	<b>21,8 (16,1–28,7)</b>	<b>32,7</b>	<b>&lt;0,05</b>
HEMO 100 (%)	52,7 (45,7–63,7)	19,4	56,0 (50,3–66,3)	17,2	>0,05
HEMO 150 (%)	81,9 (78,3–86,0)	9,1	80,3 (72,6–85,5)	9,4	>0,05
G6-PD (U/gHb)	5,9 (5,1–6,6)	19,2	6,3 (5,6–6,9)	17,5	>0,05
SOD (U/gHb)	1786,7 (1414,1–2240,0)	25,3	1777,8 (1512,7–2191,8)	24,5	>0,05
CAT (U/gHb)	$2,7 \times 10^5$ ( $2,2 \times 10^5$ – $3,3 \times 10^5$ )	28,2	$2,7 \times 10^5$ ( $2,1 \times 10^5$ – $3,1 \times 10^5$ )	26,5	>0,05
ERO (UF/gHb)	1478,0 (1196,0–1760,0)	19,1	1459,0 (1149,0 – 1769,0)	21,2	>0,05

NOTA: Dados apresentados como mediana e intervalos interquartil.

META – meta-hemoglobina, GSH – glutatona reduzida, HEMO – percentagem de hemólise com adição de soluções com 0-150 mmol/l de AAPH, G6-PD – glucose 6-fosfato desidrogenase, SOD – superóxido dismutase, CAT – catalase, ERO – espécies reativas de oxigênio, CV – coeficiente de variação.

<sup>a</sup> Teste *t* de Student.

<sup>b</sup> Estatisticamente significativa.

A Tabela 5 apresenta os valores dos parâmetros relacionados ao estresse oxidativo dos pacientes com DF antes de iniciarem o tratamento com hidroxiureia, em comparação com o grupo controle. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes para os parâmetros GSH, SOD e CAT. Os valores obtidos para meta-hemoglobina, TBARS, hemólise, G6-PD e ERO foram significativamente maiores nos pacientes, em comparação aos do grupo controle.

TABELA 5 – PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO NOS PACIENTES COM DF ATENDIDOS NO AMBULATÓRIO DE HEMATOPEDIATRIA DO HC/UFPR EM COMPARAÇÃO COM O GRUPO CONTROLE

	GRUPO CONTROLE N = 100	PACIENTES N = 41	$p^a$
<b>META (%)<sup>b</sup></b>	<b>2,3 (2,0 – 2,4)</b>	<b>4,1 (3,7 – 5,2)</b>	<b>&lt;0,001</b>
GSH ( $\mu\text{mol/gHb}$ )	6,3 (5,2 – 7,4)	6,4 (5,2 – 8,0)	>0,05
<b>TBARS (nmol/gHb)<sup>b</sup></b>	<b>23,8 (19,9 – 29,9)</b>	<b>38,4 (24,0 – 51,8)</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>HEMO 0 (%)<sup>b</sup></b>	<b>1,1 (0,8 – 1,4)</b>	<b>4,8 (3,8 – 5,7)</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>HEMO 50 (%)<sup>b</sup></b>	<b>25,8 (17,1 – 31,9)</b>	<b>49,2 (39,1 – 60,0)</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>HEMO 100 (%)<sup>b</sup></b>	<b>55,2 (48,2 – 64,8)</b>	<b>81,0 (80,7 – 88,3)</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>HEMO 150 (%)<sup>b</sup></b>	<b>81,0 (74,9 – 95,8)</b>	<b>92,6 (91,5 – 95,5)</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>G6-PD (U/gHb)<sup>b</sup></b>	<b>6,2 (5,3 – 6,8)</b>	<b>13,6 (11,1 – 15,2)</b>	<b>&lt;0,001</b>
SOD (U/gHb)	1777,8 (1445,2 – 2231,1)	1832,4 (1296,3 – 2218,0)	>0,05
CAT (U/gHb)	$2,7 \cdot 10^5$ ( $2,2 \cdot 10^5$ – $3,2 \cdot 10^5$ )	$2,8 \cdot 10^5$ ( $2,2 \cdot 10^5$ – $3,2 \cdot 10^5$ )	>0,05
<b>ERO (UF/gHb)<sup>b</sup></b>	<b>1462,5 (1196,4 – 1675,4)</b>	<b>2427,5 (1535,0 – 2950,0)</b>	<b>&lt;0,001</b>

NOTA: Dados apresentados como mediana e intervalos interquartil.

META – meta-hemoglobina, GSH – glutatona reduzida, TBARS – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, HEMO – hemólise com adição de 0-150 mmol/l de soluções de AAPH, G6-PD – glucose 6-fosfato desidrogenase, SOD – superóxido dismutase, CAT – catalase, ERO – espécies reativas de oxigênio.

<sup>a</sup> Teste *t* de Student.

<sup>b</sup> Estatisticamente significativa.

A Tabela 6 apresenta os valores dos parâmetros relacionados ao estresse oxidativo divididos por manifestação da DF (HbSS, HbSC e HbS $\beta$ ). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas nos resultados entre os diferentes tipos da doença.

TABELA 6 – PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO NOS PACIENTES COM DF ATENDIDOS NO AMBULATÓRIO DE HEMATOPEDIATRIA DO HC/UFPR, SEPARADOS POR MANIFESTAÇÃO DA DOENÇA, CURITIBA-PR, JUNHO DE 2013 A AGOSTO DE 2015

	PACIENTES SS N = 23	PACIENTES SC N = 10	PACIENTES S $\beta$ N = 8	$p^a$
META (%)	4,1 (3,7 – 4,9)	4,1 (3,8 – 4,8)	5,9 (4,5 – 6,6)	>0,05
GSH ( $\mu\text{mol/gHb}$ )	6,7 (5,3 – 8,6)	6,3 (5,8 – 7,1)	6,3 (5,0 – 8,4)	>0,05
TBARS (nmol/gHb)	33,7 (24,6 – 49,8)	37,0 (31,5 – 42,6)	41,7 (29,2 – 66,6)	>0,05
HEMO 0 (%)	4,1 (3,2 – 4,8)	5,3 (3,0 – 6,0)	5,5 (4,4 – 4,8)	>0,05
HEMO 50 (%)	36,6 (18,8 – 47,9)	27,3 (24,9 – 40,1)	42,8 (22,5 – 57,9)	>0,05
HEMO 100 (%)	73,0 (57,5 – 86,4)	77,8 (57,7 – 81,3)	78,0 (70,5 – 96,4)	>0,05
HEMO 150 (%)	93,3 (84,6 – 96,3)	92,1 (90,0 – 96,3)	91,9 (87,6 – 97,3)	>0,05
G6-PD (U/gHb)	13,4 (11,9 – 15,6)	11,3 (10,1 – 12,0)	15,2 (11,7 – 22,0)	>0,05
SOD ( $\times 10^3$ U/gHb)	2,2 (1,2 – 2,8)	1,3 (1,0 – 1,7)	1,4 (1,3 – 1,9)	>0,05
CAT ( $\times 10^5$ U/gHb)	2,9 (2,3 – 3,4)	3,4 (3,1 – 3,8)	2,9 (2,4 – 3,8)	>0,05
ERO ( $\times 10^3$ UF/gHb)	2,5 (1,2 – 3,9)	1,7 (1,3 – 2,8)	2,0 (1,5 – 2,4)	>0,05

NOTA: Dados apresentados como mediana e intervalos interquartil.

META – meta-hemoglobina, GSH – glutatona reduzida, TBARS – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, HEMO – hemólise com adição de 0-150 mmol/l de soluções de AAPH, G6-PD – glucose 6-fosfato desidrogenase, SOD – superóxido dismutase, CAT – catalase, ERO – espécies reativas de oxigênio.

<sup>a</sup> Teste de Tukey



A Tabela 7 apresenta os valores dos parâmetros relacionados ao estresse oxidativo nos pacientes com DF, divididos por haplótipo da  $\beta$  globina. Os haplótipos foram obtidos dos prontuários dos pacientes, tendo sido determinados em outro estudo realizado com os mesmos no Ambulatório de Hematopediatria do HC/UFPR (WATANABE, 2015). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas nos resultados entre os diferentes haplótipo da doença.

TABELA 7 – PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO NOS PACIENTES COM DF ATENDIDOS NO AMBULATÓRIO DE HEMATOPEDIATRIA DO HC/UFPR, SEPARADOS POR HAPLÓTIPO DO GENE DA  $\beta$  GLOBINA, CURITIBA-PR, JUNHO DE 2013 A AGOSTO DE 2015

	BAN N = 24	BEN/BAN N = 6	BEN N = 6	$p^a$
META (%)	4,9 (4,2 – 5,9)	3,9 (3,4 – 4,0)	4,0 (3,8 – 4,9)	>0,05
GSH ( $\mu\text{mol/gHb}$ )	5,9 (5,0 – 8,0)	6,6 (6,3 – 7,2)	6,9 (6,0 – 8,3)	>0,05
TBARS ( $\text{nmol/gHb}$ )	41,3 (29,5 – 67,0)	36,8 (36,6 – 39,2)	36,1 (27,5 – 42,6)	>0,05
HEMO 0 (%)	4,2 (3,0 – 5,7)	6,5 (4,0 – 9,0)	4,0 (3,0 – 5,3)	>0,05
HEMO 50 (%)	42,0 (24,6 – 55,4)	30,0 (24,6 – 55,4)	32,0 (15,6 – 40,1)	>0,05
HEMO 100 (%)	81,4 (64,5 – 88,3)	71,4 (54,5 – 81,3)	71,4 (64,5 – 78,3)	>0,05
HEMO 150 (%)	92,9 (87,7 – 95,6)	91,9 (86,7 – 94,6)	92,9 (87,7 – 95,6)	>0,05
G6-PD (U/gHb)	13,3 (11,6 – 15,5)	13,8 (13,0 – 17,1)	13,9 (11,0 – 16,5)	>0,05
SOD ( $\times 10^3 \text{U/gHb}$ )	1,8 (1,3 – 2,2)	2,4 (1,2 – 3,2)	2,4 (1,7 – 2,4)	>0,05
CAT ( $\times 10^5 \text{U/gHb}$ )	3,4 (2,2 – 3,8)	3,0 (2,8 – 3,8)	3,0 (2,8 – 3,4)	>0,05
ERO ( $\times 10^3 \text{UF/gHb}$ )	2,4 (1,5 – 4,4)	2,0 (1,6 – 2,4)	2,4 (1,4 – 2,9)	>0,05

NOTA: Dados apresentados como mediana e intervalos interquartil.

BAN – haplótipo Bantu, BEN/BAN – haplótipo Benin/Bantu, BEN – haplótipo Benin, META – meta-hemoglobina, GSH – glutathiona reduzida, TBARS – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, HEMO – hemólise com adição de 0-150 mmol/l de soluções de AAPH, G6-PD – glucose 6-fosfato desidrogenase, SOD – superóxido dismutase, CAT – catalase, ERO – espécies reativas de oxigênio.

<sup>a</sup> Teste de Tukey

A Tabela 8 apresenta os valores dos parâmetros relacionados ao estresse oxidativo dos pacientes com DF antes e durante o tratamento com hidroxiureia nos diversos tempos estudados (Grupos 1 a 5). Foram observadas diferenças estatisticamente significativas para os parâmetros meta-hemoglobina, TBARS basal, catalase e ERO basal.

TABELA 8 – PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO NOS PACIENTES COM DF ATENDIDOS NO AMBULATÓRIO DE HEMATOPEDIATRIA DO HC/UFPR ANTES E DURANTE O TRATAMENTO COM HIDROXIUREIA, CURITIBA-PR, JUNHO DE 2013 A AGOSTO DE 2015

GRUPO		1 N = 41	2 N = 22	3 N = 15	4 N = 16	5 N = 11	p <sup>a</sup>
<b>META<sup>b</sup></b>	<b>Mediana</b>	<b>5,1</b>	<b>4,7</b>	<b>4,0</b>	<b>4,3</b>	<b>4,1</b>	<b>&lt;0,001</b>
	<b>Intervalo</b>	<b>3,9 – 6,1</b>	<b>3,7 – 5,0</b>	<b>3,6 – 4,4</b>	<b>3,0 – 4,9</b>	<b>3,7 – 4,7</b>	
	<b>CV</b>	<b>29,3</b>	<b>18,4</b>	<b>14,9</b>	<b>19,9</b>	<b>27,2</b>	
GSH 0	Mediana	6,3	7,0	5,5	6,1	6,2	>0,05
	Intervalo	5,3 – 7,8	5,6 – 8,3	4,7 – 6,7	4,7 – 6,3	5,5 – 7,3	
	CV	30,0	32,7	40,8	22,7	25,9	
GSH 2	Mediana	0,8	1,0	1,0	0,9	0,8	>0,05
	Intervalo	0,7 – 1,5	0,3 – 1,4	0,5 – 1,7	0,6 – 1,0	0,6 – 1,4	
	CV	66,9	73,8	63,2	51,7	27,2	
<b>TBARS 0<sup>b</sup></b>	<b>Mediana</b>	<b>58,8</b>	<b>46,2</b>	<b>33,6</b>	<b>46,5</b>	<b>47,5</b>	<b>&lt;0,001</b>
	<b>Intervalo</b>	<b>30,8 – 66,3</b>	<b>40,3 – 61,3</b>	<b>28,8 – 64,1</b>	<b>28,8 – 64,0</b>	<b>30,8 – 59,8</b>	
	<b>CV</b>	<b>48,6</b>	<b>51,6</b>	<b>76,1</b>	<b>71,7</b>	<b>52,6</b>	
TBARS 2	Mediana	603,4	612,5	620,0	604,9	493,1	>0,05
	Intervalo	497 – 731	346 – 662	522 – 735	515 – 744	459 – 698	
	CV	33,0	41,2	32,2	24,8	37,3	
HEMO 0	Mediana	4,5	4,4	5,3	4,3	4,8	>0,05
	Intervalo	3,0 – 5,5	4,0 – 5,8	4,4 – 6,6	3,5 – 4,9	4,3 – 7,6	
	CV	40,9	41,7	32,3	19,4	33,9	
HEMO 50	Mediana	33,8	42,9	42,2	25,4	25,3	>0,05
	Intervalo	20,3 – 49,2	20,1 – 68,5	22,4 – 58,9	14,4 – 47,0	19,5 – 49,3	
	CV	57,1	57,8	57,7	57,7	66,1	
HEMO 100	Mediana	77,8	81,5	84,8	76,3	84,6	>0,05
	Intervalo	57,5 – 86,4	56,1 – 92,8	73,9 – 90,0	62,4 – 91,5	47,9 – 89,2	
	CV	26,1	37,0	14,6	22,7	31,9	
HEMO 150	Mediana	92,1	90,7	94,4	92,5	92,7	>0,05
	Intervalo	87,7 – 96,3	84,9 – 97,3	89,9 – 97,3	82,2 – 95,1	86,4 – 96,6	
	CV	9,4	11,7	4,7	7,8	9,1	
G6-PD	Mediana	13,2	13,1	11,4	13,0	10,2	>0,05
	Intervalo	11,1 – 15,8	10,0 – 15,6	8,6 – 15,7	10,1 – 14,4	8,2 – 13,4	
	CV	29,2	35,3	40,2	30,5	30,4	
<b>CAT (x10<sup>5</sup>)<sup>b</sup></b>	<b>Mediana</b>	<b>3,3</b>	<b>3,0</b>	<b>2,9</b>	<b>2,1</b>	<b>2,5</b>	<b>&lt;0,001</b>
	<b>Intervalo</b>	<b>2,4 – 3,8</b>	<b>2,7 – 4,0</b>	<b>2,5 – 3,2</b>	<b>1,6 – 2,7</b>	<b>2,2 – 3,4</b>	
	<b>CV</b>	<b>29,1</b>	<b>30,6</b>	<b>25,2</b>	<b>28,1</b>	<b>23,5</b>	
SOD (x10 <sup>3</sup> )	Mediana	1,9	1,8	1,3	1,6	1,5	>0,05
	Intervalo	1,2 – 2,4	1,1 – 2,1	0,7 – 1,7	1,3 – 1,9	1,3 – 1,9	
	CV	41,4	49,6	69,3	32,1	31,3	
<b>ERO (x10<sup>3</sup>)<sup>b</sup></b>	<b>Mediana</b>	<b>2,0</b>	<b>1,7</b>	<b>1,8</b>	<b>1,4</b>	<b>1,4</b>	<b>&lt;0,05</b>
	<b>Intervalo</b>	<b>1,3 – 2,8</b>	<b>1,3 – 1,9</b>	<b>1,2 – 2,0</b>	<b>1,0 – 2,3</b>	<b>1,0 – 1,6</b>	
	<b>CV</b>	<b>56,2</b>	<b>28,1</b>	<b>49,1</b>	<b>61,9</b>	<b>32,4</b>	
ERO 175 (x10 <sup>4</sup> )	Mediana	6,2	5,9	4,1	5,2	4,5	>0,05
	Intervalo	5,0 – 9,3	4,2 – 7,3	2,6 – 5,5	3,6 – 7,0	3,9 – 5,7	
	CV	62,3	45,4	84,3	84,5	32,2	

NOTA: Dados apresentados como mediana e intervalos interquartil. META – meta-hemoglobina (%), GSH – glutatona reduzida com adição de 0 e 2 mmol/l de tBHP (μmol/gHb), TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico com adição de 0 e 2 mmol/l de tBHP (nmol/gHb), HEMO – hemólise com adição de 0-150 mmol/l de soluções de AAPH (%), G6PD – atividade da glucose 6-fosfato desidrogenase (U/gHb), CAT – atividade da catalase (U/gHb), SOD - atividade da superóxido dismutase (U/gHb), ERO – espécies reativas de oxigênio com adição de solução 0 e 175 mmol/l de tBHP (UF/gHb). Grupos: 1 – antes do tratamento com hidroxiureia (n = 41), 2 – após 3 meses de tratamento (n=22), 3 – após 6 meses de tratamento (n = 15), 4 – após 9 meses de tratamento (n = 16), 5 – após mais de 12 meses de tratamento (n = 11).

<sup>a</sup> Teste de Tukey.

<sup>b</sup> Estatisticamente significante.

### 5.5.1 Determinação da Meta-hemoglobina

O Gráfico 8 ilustra os resultados de meta-hemoglobina nos pacientes com doença falciforme antes de iniciarem o tratamento com hidroxiureia, em comparação ao grupo controle, sendo observadas diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,001$ ).

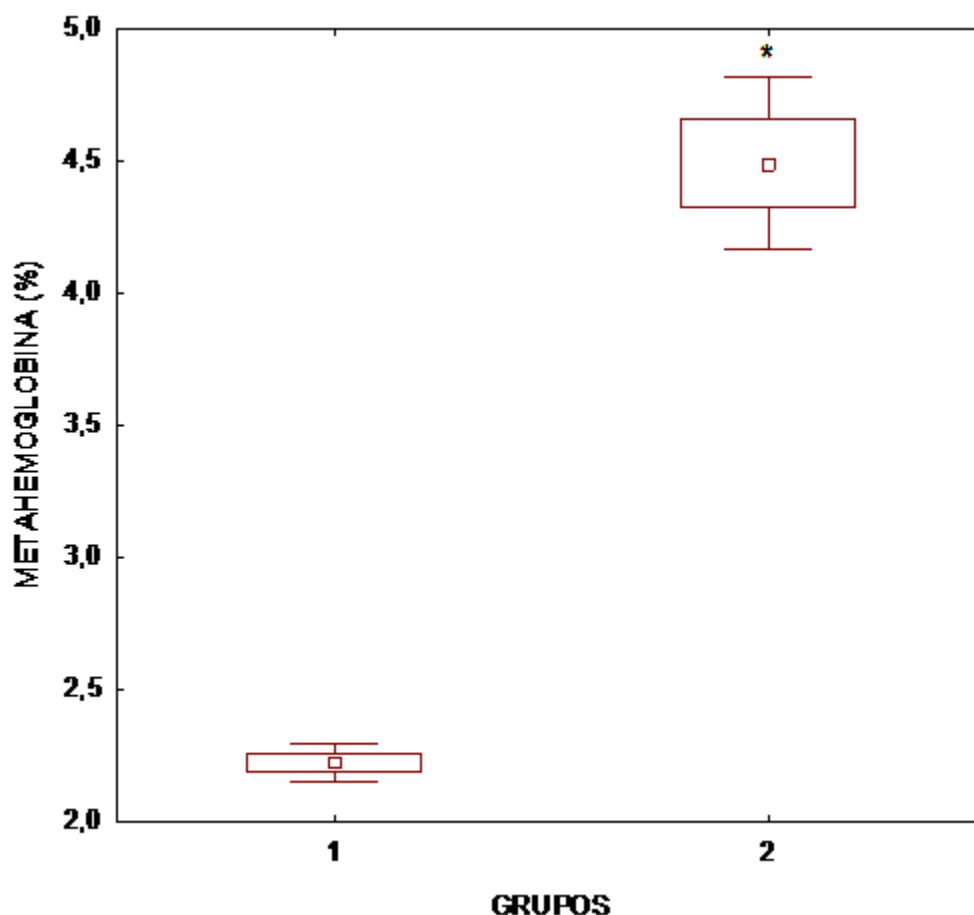


GRÁFICO 8 – PORCENTAGENS DE META-HEMOGLOBINA NOS PACIENTES COM DF ATENDIDOS NO AMBULATÓRIO DE HEMATOPEDIATRIA DO HC/UFPR EM COMPARAÇÃO COM O GRUPO CONTROLE

NOTA: Grupos: 1 – Grupo controle (n = 100), 2 – Pacientes com DF (n = 41).

\* - diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ), teste *t* de Student.

O Gráfico 9 mostra os valores de meta-hemoglobina nos pacientes, antes e durante o tratamento com hidroxiureia. Foi observada redução significativa entre os valores obtidos antes e durante o uso da medicação ( $p < 0,001$ ), sem diferenças significativas nas reduções após 3, 6, 9 ou entre 12 e 24 meses de tratamento.

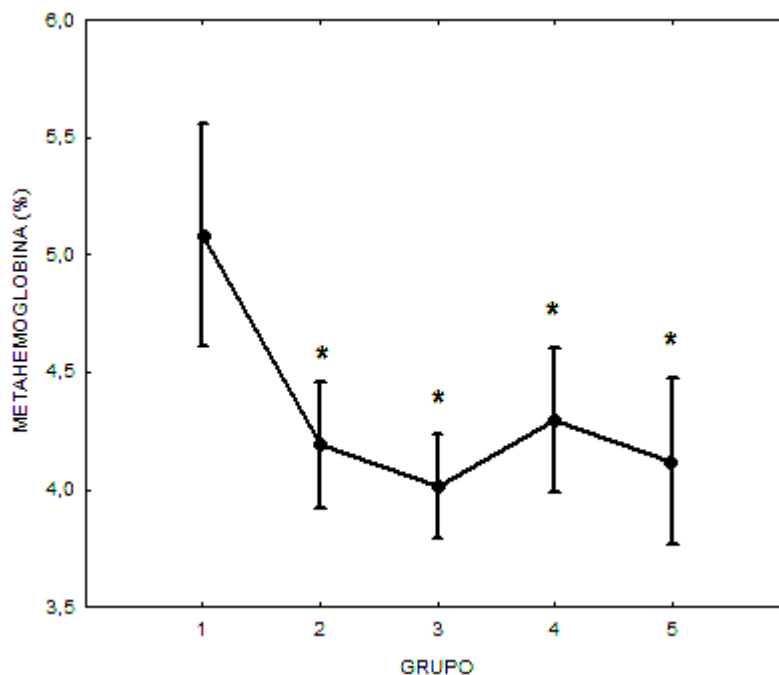


GRÁFICO 9 – VALORES DE META-HEMOGLOBINA NOS PACIENTES COM DF ATENDIDOS NO AMBULATÓRIO DE HEMATOPEDIATRIA DO HC/UFPR ANTES E DURANTE O TRATAMENTO COM HIDROXIUREIA, CURITIBA-PR, JUNHO DE 2013 A AGOSTO DE 2015

NOTA: Grupos: 1 – antes do tratamento com hidroxiureia (n = 41), 2 – após 3 meses de tratamento (n = 22), 3 – após 6 meses de tratamento (n = 15), 4 – após 9 meses de tratamento (n = 16), 5 – após 12 a 24 meses de tratamento (n = 11), dentro do grupo de 41 pacientes em estudo.

\* - diferença estatisticamente significativa para meta-hemoglobina entres os grupos 1, 2, 3, 4 e 5 ( $p < 0,001$ ), teste de Tukey.

### 5.5.2. Concentrações de GSH

O Gráfico 10 ilustra os resultados das dosagens de GSH nos pacientes com doença falciforme, antes de iniciarem o tratamento com hidroxiureia, em comparação ao grupo controle. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos.

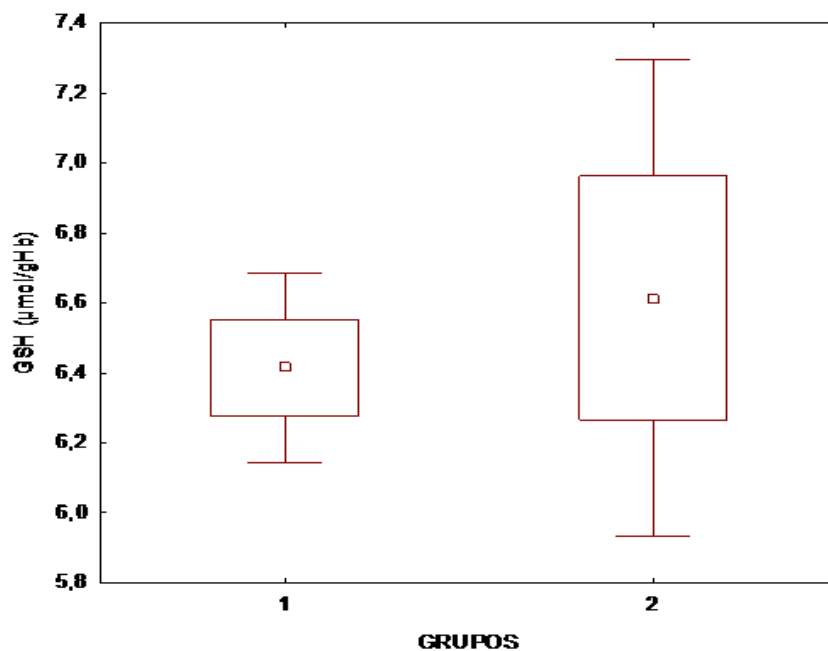


GRÁFICO 10 – DOSAGEM DE GSH NOS PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME ATENDIDOS NO AMBULATÓRIO DE HEMATOPEDIATRIA DO HC/UFPR EM COMPARAÇÃO COM O GRUPO CONTROLE  
NOTA: Grupos: 1 – Grupo controle (n = 100), 2 – Pacientes com DF (n = 41).

No Gráfico 11 são mostrados os resultados das concentrações de GSH nos pacientes com doença falciforme antes e durante o tratamento com hidroxiureia. Não houve diferenças significativas nos valores. Após incubação dos eritrócitos dos pacientes com solução de  $\alpha$ BHP na concentração de 2 mmol/l, verificou-se que há consumo de praticamente toda a GSH e a hidroxiureia não apresentou nenhum efeito protetor mediante a ação do oxidante.

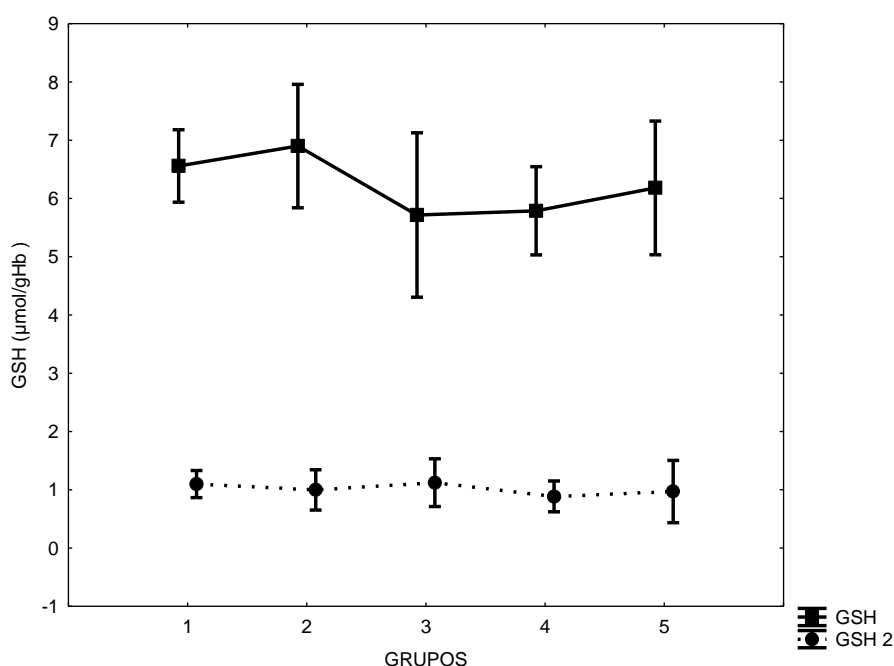


GRÁFICO 11 – VALORES DE GSH NOS PACIENTES COM DF ATENDIDOS NO AMBULATÓRIO DE HEMATOPEDIATRIA DO HC/UFPR EM ANTES E DURANTE O TRATAMENTO COM HIDROXIUREIA, CURITIBA-PR, JUNHO DE 2013 A AGOSTO DE 2015

NOTA: GSH 2 - glutathiona reduzida com adição de 2 mmol/l de  $\alpha$ BHP, Grupos:

1 – antes do tratamento com hidroxiureia (n = 41), 2 – após 3 meses de tratamento (n = 22), 3 – após 6 meses de tratamento (n = 15), 4 – após 9 meses de tratamento (n = 16), 5 – após 12 a 24 meses de tratamento (n = 11), dentro do grupo de 41 pacientes incluídos no estudo.

### 5.5.3. Concentrações de TBARS

O Gráfico 12 ilustra os resultados das determinações de TBARS nos pacientes com doença falciforme, antes de iniciarem o tratamento com hidroxiureia, em comparação ao grupo controle, sendo observadas diferenças estatisticamente significantes ( $p < 0,001$ ).

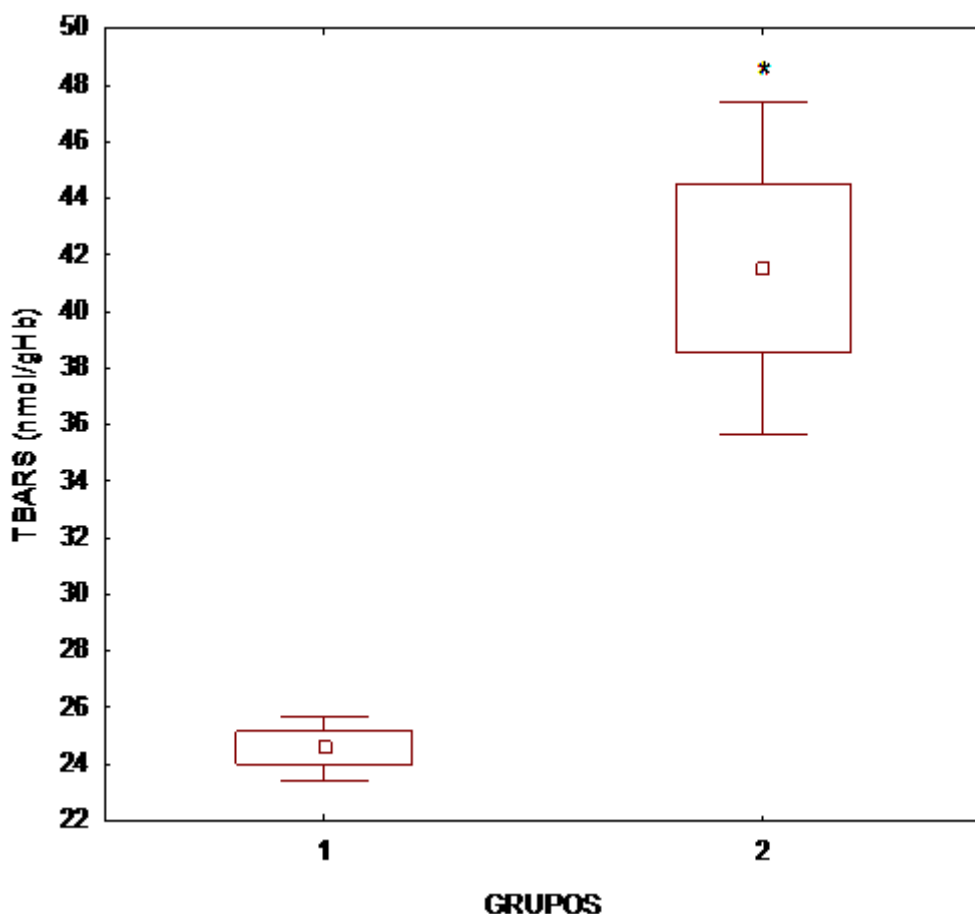


GRÁFICO 12 – CONCENTRAÇÕES DE TBARS NOS PACIENTES COM DF ATENDIDOS NO AMBULATÓRIO DE HEMATOPEDIATRIA DO HC/UFPR EM COMPARAÇÃO COM O GRUPO CONTROLE

NOTA: Grupos: 1 – Grupo controle (n = 100), 2 – Pacientes com DF (n = 41).

\* - diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ), teste *t* de Student.

No Gráfico 13 são mostrados os resultados das concentrações de TBARS nos pacientes com doença falciforme antes e durante o tratamento com hidroxiureia, sendo observadas diferenças significativas, em relação às TBARS basais ( $p<0,05$ ), porém sem diferenças entre os tempos de tratamento. Após incubação dos eritrócitos dos pacientes com solução de tBHP na concentração de 2 mmol/l, verificou-se que há um aumento considerável nas TBARS e a hidroxiureia não apresentou efeito protetor mediante a ação do oxidante.

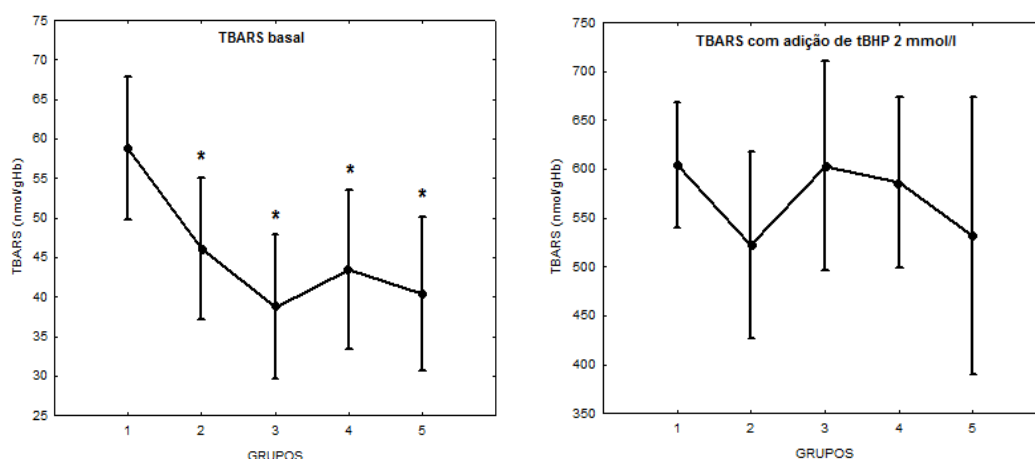


GRÁFICO 13 – VALORES DE TBARS NOS PACIENTES COM DF ATENDIDOS NO AMBULATÓRIO DE HEMATOPEDIATRIA DO HC/UFPR EM ANTES E DURANTE O TRATAMENTO COM HIDROXIUREIA, CURITIBA-PR, JUNHO DE 2013 A AGOSTO DE 2015

NOTA: Grupos: 1 – antes do tratamento com hidroxiureia (n =41), 2 - após 3 meses de tratamento (n =22), 3 - após 6 meses de tratamento (n =15), 4 - após 9 meses de tratamento (n =16), 5 - após 12 a 24 meses de tratamento (n=11), dentro do grupo de 41 pacientes incluídos no estudo.

\* - diferenças estatisticamente significativas para TBARS basal ( $p<0,05$ ) teste de Tukey.



#### 5.5.4. Determinação da Atividade Enzimática da G6-PD

O Gráfico 14 ilustra os resultados das determinações da atividade enzimática da G6-PD nos pacientes com doença falciforme, antes de iniciarem o tratamento com hidroxureia, em comparação ao grupo controle, sendo observadas diferenças estatisticamente significantes ( $p < 0,001$ ).

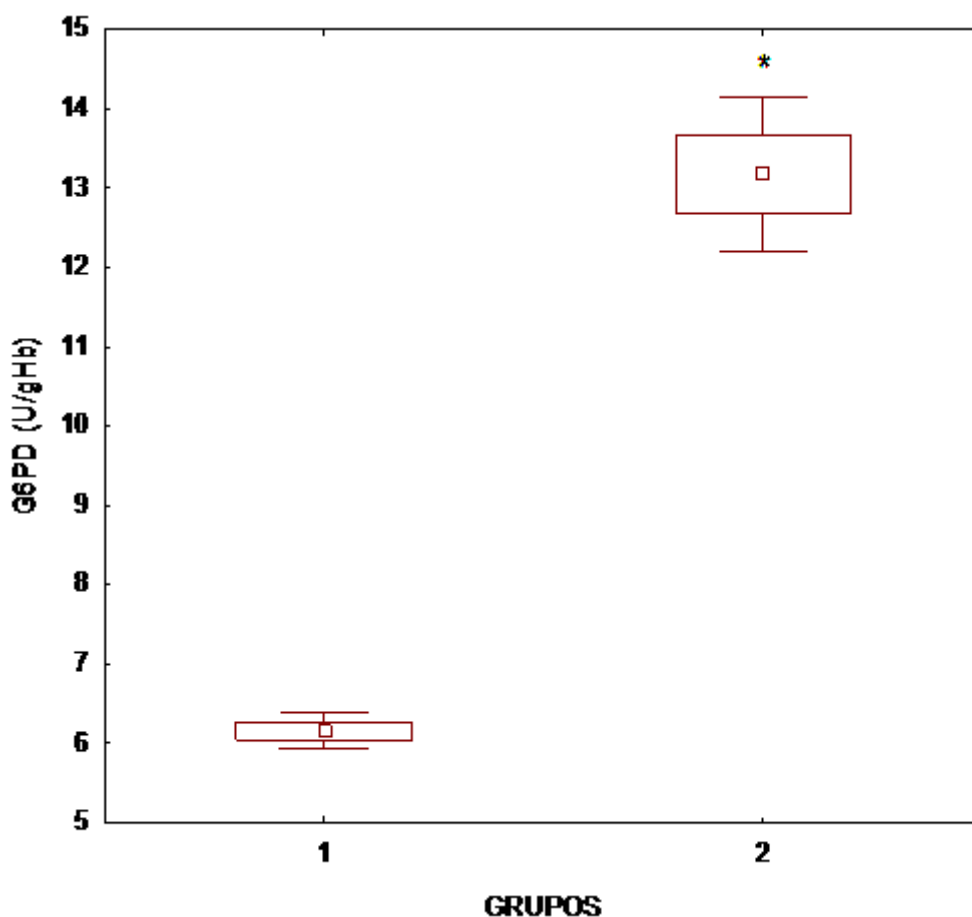


GRÁFICO 14 – DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA G6-PD NOS PACIENTES COM DF ATENDIDOS NO AMBULATÓRIO DE HEMATOPEDIATRIA DO HC/UFPR EM COMPARAÇÃO COM O GRUPO CONTROLE

NOTA: Grupos 1 – Grupo controle (n = 100), 2 – Pacientes com DF (n = 41).

\* - diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ), teste *t* de Student.

No Gráfico 15 são mostrados os resultados da atividade enzimática da G6-PD nos pacientes com doença falciforme antes e durante o tratamento com hidroxiureia. Não houve diferenças significativas nos valores determinados.

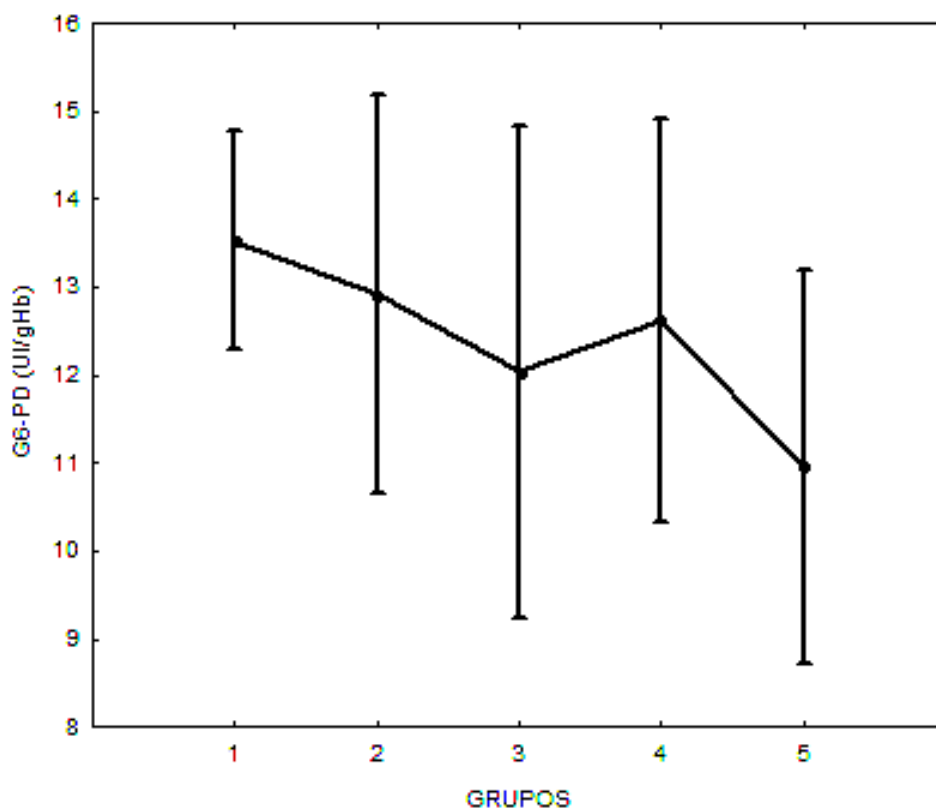


GRÁFICO 15 – DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA G6-PD NOS PACIENTES COM DF ATENDIDOS NO AMBULATÓRIO DE HEMATOPEDIATRIA DO HC/UFPR ANTES E DURANTE O TRATAMENTO COM HIDROXIUREIA, CURITIBA-PR, JUNHO DE 2013 A AGOSTO DE 2015

NOTA: Grupos: 1 – antes do tratamento com hidroxiureia (n =41), 2 - após 3 meses de tratamento (n =22), 3 - após 6 meses de tratamento (n =15), 4 - após 9 meses de tratamento (n =16), 5 - após 12 a 24 meses de tratamento (n=11), dentro do grupo de 41 pacientes incluídos no estudo.

### 5.5.5. Determinação das Porcentagens de Hemólise

O Gráfico 16 ilustra os resultados das determinações das porcentagens de hemólise nos pacientes com doença falciforme, antes de iniciarem o tratamento com hidroxiureia, em comparação ao grupo controle. Suspensões de eritrócitos dos pacientes e do grupo controle foram incubadas com soluções do agente oxidante AAPH nas concentrações de 0, 50, 100 e 150 mmol/l, sendo observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos para todas as concentrações ( $p < 0,001$ ).

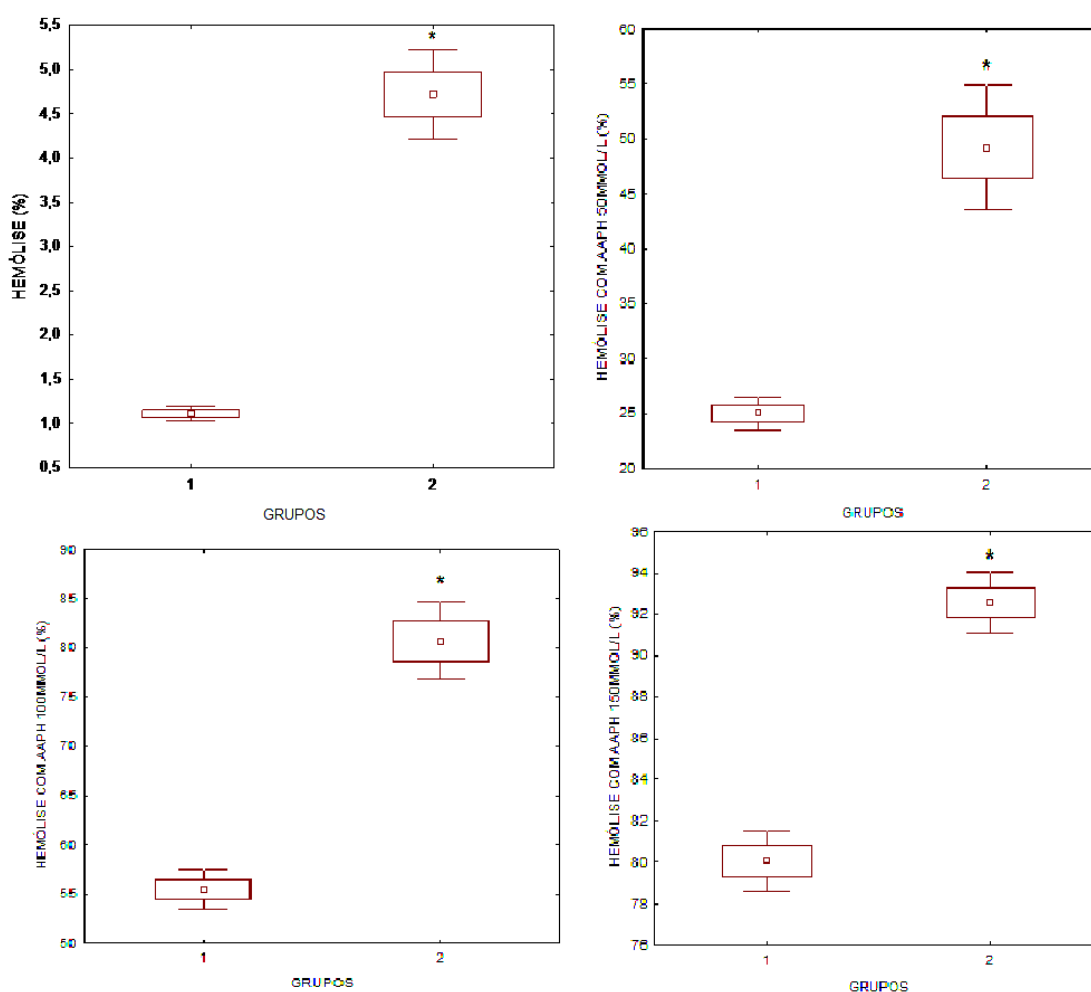


GRÁFICO 16 – PORCENTAGENS DE HEMÓLISE NOS PACIENTES COM DF ATENDIDOS NO AMBULATÓRIO DE HEMATOPEDIATRIA DO HC/UFPR EM COMPARAÇÃO COM O GRUPO CONTROLE, COM ADIÇÃO DE 0-150MMOL/L DE AAPH  
 NOTA: Grupos 1 – Grupo controle (n = 100), 2 – Pacientes com DF (n = 41).

\* - diferenças estatisticamente significantes ( $p < 0,001$ ) teste *t* de Student.

No Gráfico 17 são mostrados os resultados das porcentagens de hemólise nos pacientes com doença falciforme antes e durante o tratamento com hidroxiureia, com incubação de suspensões de eritrócitos com soluções de AAPH de 0 a 150 mmol/l. Não foi observado nenhum efeito protetor da hidroxiureia contra a ação do agente oxidante.

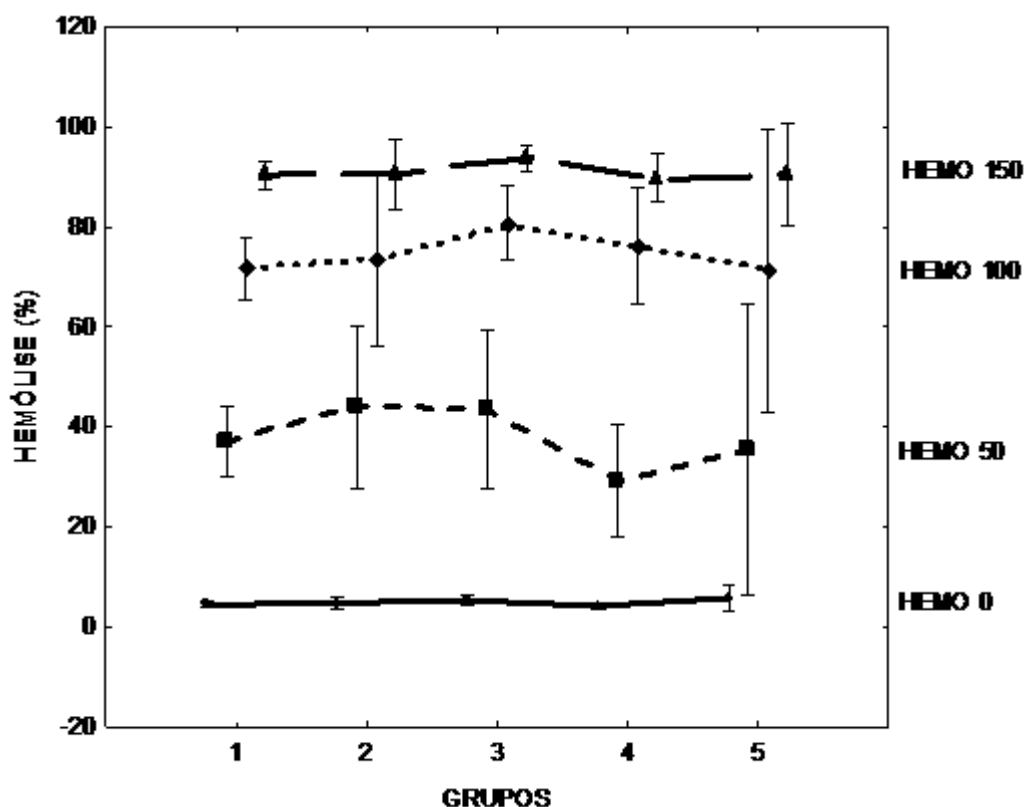


GRÁFICO 17 – PORCENTAGENS DE HEMÓLISE NOS PACIENTES COM DF ATENDIDOS NO AMBULATÓRIO DE HEMATOPEDIATRIA DO HC/UFPR ANTES E DURANTE O TRATAMENTO COM HIDROXIUREIA COM ADIÇÃO DE 0-150 MMOL/L DE AAPH, CURITIBA-PR, JUNHO DE 2013 A AGOSTO DE 2015

NOTA: Grupos: 1 – antes do tratamento com hidroxiureia (n =41), 2 – após 3 meses de tratamento (n =22), 3 – após 6 meses de tratamento (n =15), 4 – após 9 meses de tratamento (n =16), 5 – após 12 a 24 meses de tratamento (n=11), dentro do grupo de 41 pacientes incluídos no estudo.

### 5.5.6. Determinação da Atividade Enzimática da Catalase

O Gráfico 18 ilustra os resultados das determinações da atividade enzimática da catalase nos pacientes com doença falciforme, antes de iniciarem o tratamento com hidroxiureia, em comparação ao grupo controle. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas.

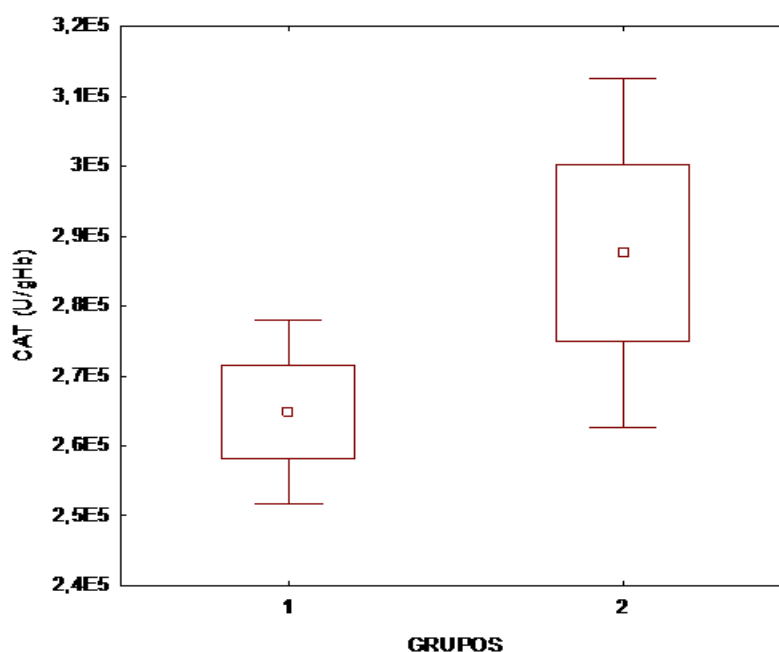


GRÁFICO 18 – DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA CATALASE NOS PACIENTES COM DF ATENDIDOS NO AMBULATÓRIO DE HEMATOPEDIATRIA DO HC/UFPR EM COMPARAÇÃO COM O GRUPO CONTROLE

NOTA: Grupos 1 – Grupo controle (n = 100), 2 – Pacientes com DF (n = 41).

No Gráfico 19 são mostrados os resultados da atividade enzimática da catalase nos pacientes com doença falciforme antes e durante o tratamento com hidroxiureia. Foi observada uma redução significativa entre os valores antes e depois do uso do medicamento ( $p<0,001$ ), sem diferenças nas reduções após 6, 9 e 12 a 24 meses de tratamento.

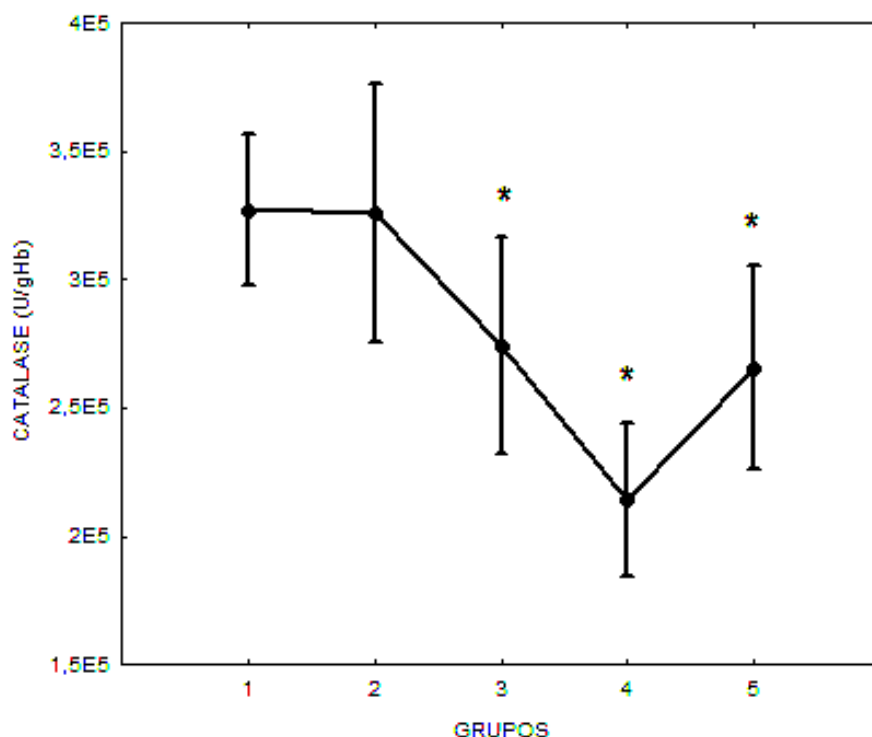


GRÁFICO 19 – DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA CATALASE NOS PACIENTES COM DF ATENDIDOS NO AMBULATÓRIO DE HEMATOPEDIATRIA DO HC/UFPR ANTES E DURANTE O TRATAMENTO COM HIDROXIUREIA, CURITIBA-PR, JUNHO DE 2013 A AGOSTO DE 2015  
 NOTA: Grupos: 1 – antes do tratamento com hidroxiureia (n =41), 2 - após 3 meses de tratamento (n =22), 3 - após 6 meses de tratamento (n =15), 4 - após 9 meses de tratamento (n =16), 5 - após 12 a 24 meses de tratamento (n=11), dentro do grupo de 41 pacientes incluídos no estudo.

\* - diferenças estatisticamente significativas ( $p<0,001$ ), teste de Tukey.

### 5.5.7. Determinação da Atividade Enzimática da Superóxido Dismutase

O Gráfico 20 ilustra os resultados das determinações da atividade enzimática da SOD nos pacientes com doença falciforme, antes de iniciarem o tratamento com hidroxiureia, em comparação ao grupo controle. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes.

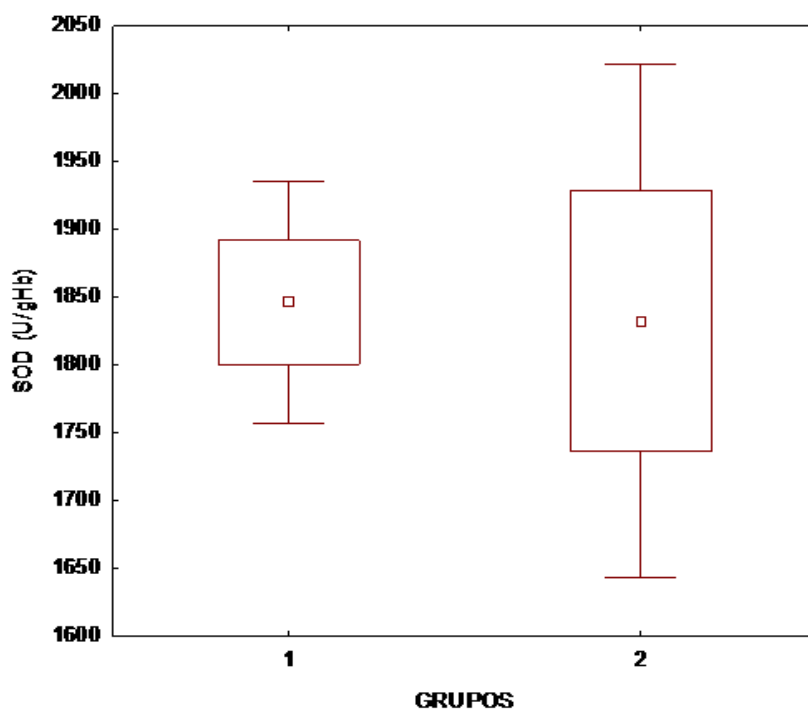


GRÁFICO 20 – DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA SOD NOS PACIENTES COM DF ATENDIDOS NO AMBULATÓRIO DE HEMATOPEDIATRIA DO HC/UFPR EM COMPARAÇÃO COM O GRUPO CONTROLE  
NOTA: Grupos 1 – Grupo controle (n = 100), 2 – Pacientes com DF (n = 41).

No Gráfico 21 são mostrados os resultados das determinações da atividade enzimática da SOD nos pacientes com doença falciforme antes e durante o tratamento com hidroxiureia. Não houve diferenças significativas nos valores determinados.

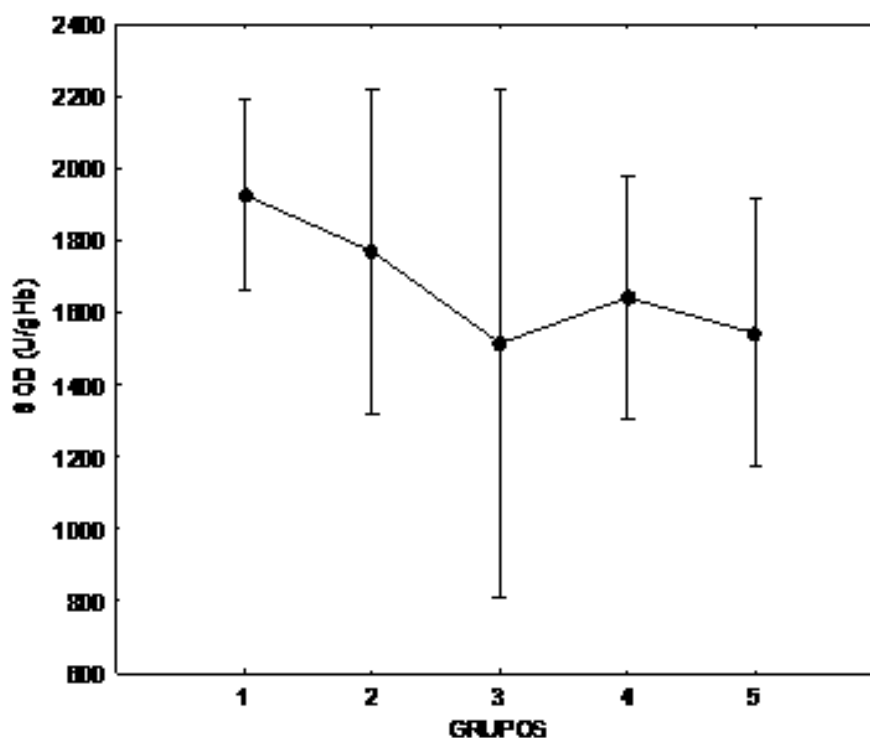


GRÁFICO 21 – DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA SOD NOS PACIENTES COM DF ATENDIDOS NO AMBULATÓRIO DE HEMATOPEDIATRIA DO HC/UFPR ANTES E DURANTE O TRATAMENTO COM HIDROXIUREIA, CURITIBA-PR, JUNHO DE 2013 A AGOSTO DE 2015

NOTA: Grupos: 1 – antes do tratamento com hidroxiureia (n =41), 2 - após 3 meses de tratamento (n =22), 3 - após 6 meses de tratamento (n =15), 4 - após 9 meses de tratamento (n =16), 5 - após 12 a 24 meses de tratamento (n=11), dentro do grupo de 41 pacientes incluídos no estudo.



### 5.5.8. Determinação das Espécies Reativas de Oxigênio

O Gráfico 22 ilustra os resultados das determinações de ERO nos pacientes com doença falciforme, antes de iniciarem o tratamento com hidroxiureia, em comparação ao grupo controle, sendo observadas diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,001$ ).

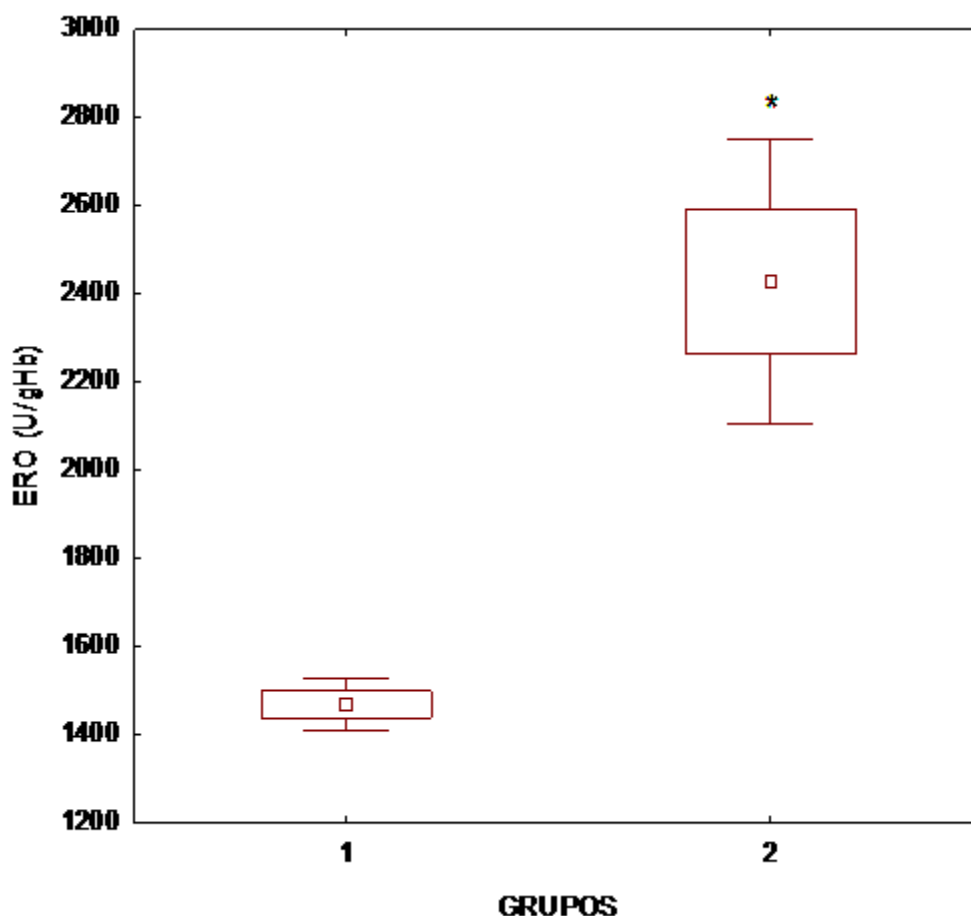


GRÁFICO 22 – DETERMINAÇÃO DE ERO NOS PACIENTES COM DF ATENDIDOS NO AMBULATÓRIO DE HEMATOPEDIATRIA DO HC/UFPR EM COMPARAÇÃO COM O GRUPO CONTROLE

NOTA: Grupos 1 – Grupo controle (n = 100), 2 – Pacientes com DF (n = 41).

\* - diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ), teste *t* de Student.

No Gráfico 23, são mostrados os resultados das determinações de ERO nos pacientes com doença falciforme antes e durante o tratamento com hidroxiureia, sendo observadas diferenças significativas entre os valores encontrados ( $p<0,05$ ), porém sem diferenças entre os tempos de tratamento. Após a incubação dos eritrócitos dos pacientes com solução de tBHP na concentração de 175 mmol/l, verificou-se que há um aumento considerável na geração de ERO e a hidroxiureia não apresentou efeito protetor mediante a ação do oxidante.

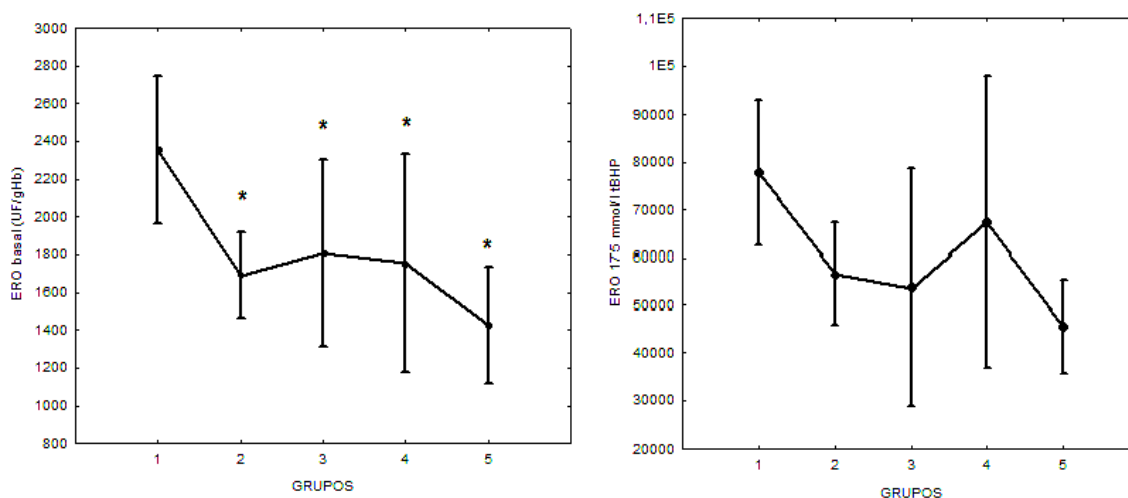


GRÁFICO 23 – DETERMINAÇÃO DE ERO NOS PACIENTES COM DF ATENDIDOS NO AMBULATÓRIO DE HEMATOPEDIATRIA DO HC/UFPR ANTES E DURANTE O TRATAMENTO COM HIDROXIUREIA COM ADIÇÃO DE 0 E 175MMOL/L DE TBHP, CURITIBA-PR, JUNHO DE 2013 A AGOSTO DE 2015

NOTA: Grupos: 1 – antes do tratamento com hidroxiureia (n =41), 2 - após 3 meses de tratamento (n =22), 3 - após 6 meses de tratamento (n =15), 4 - após 9 meses de tratamento (n =16), 5 – 12 a 24 meses de tratamento (n=11), dentro do grupo de 41 pacientes incluídos no estudo.

\* - diferenças estatisticamente significativas para ERO basal ( $p<0,05$ ) teste de Tukey.

## 6 DISCUSSÃO

A DF é a doença hematológica hereditária mais conhecida no mundo. A herança ocorre pela presença de um gene autossômico recessivo nos pais, em geral heterozigotos (HbAS). A população não-branca no Brasil foi estimada em 44,7% pelo Censo Demográfico do ano 2000, sendo que 1 a 6% destes carrega o gene da HbS, favorecendo a continuidade da doença, sugerida pela literatura como um problema de saúde pública (LERVOLINO *et al.*, 2011).

Atualmente, o Brasil possui mais de 30.000 indivíduos com DF, e cerca de 2.500 novos casos são diagnosticados anualmente pelos testes de triagem neonatal, o que a torna a disfunção genética mais comum no país (WANG, 2015). Apesar da complexidade e fisiopatologia multifatorial da doença, medidas relativamente simples melhoraram o prognóstico dos indivíduos, principalmente para a população pediátrica com DF. Tais medidas incluem o diagnóstico precoce pelos programas de triagem neonatal, a rápida criação de medidas de prevenção e intervenções terapêuticas, como o uso da hidroxiureia (MCGANN *et al.*, 2013).

Em vários estudos já foi demonstrado que implementações de políticas de saúde tiveram um impacto positivo sobre a vida dos pacientes (LOBO, 2010; SIMÕES *et al.*, 2010; LERVOLINO *et al.*, 2011; LOBO *et al.*, 2014; FERNANDES *et al.*, 2015; SABARENSE *et al.*, 2015). Após estas melhorias, um relatório de 2010 descreveu a heterogeneidade na prevalência do traço falciforme (HbAS, 1,1 - 9,8%) e da anemia falciforme (HbSS, 2,2 - 172/população de 100.000) em diferentes regiões do Brasil (WANG, 2015).

No Estado do Paraná, o diagnóstico inicial é realizado pelo Serviço de Referência em Triagem Neonatal, Fundação Ecumênica de Proteção ao Excepcional (SRTNFEPE) usando método de focalização isoelétrica, com confirmação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (WATANABE *et al.*, 2008). Os recém-nascidos com diagnóstico inicial são encaminhados ao Ambulatório de Hematopediatria do Hospital de Clínicas (HC/UFPR) em Curitiba, para a primeira consulta e acompanhamento clínico.

Todos os pacientes incluídos neste estudo, nascidos após 2001, foram diagnosticados pelos testes de triagem neonatal e encaminhados para o acompanhamento em Curitiba, provenientes de diferentes regiões do Estado

do Paraná, o que demonstra a efetividade do diagnóstico precoce garantindo acompanhamento nos primeiros meses de vida.

As manifestações clínicas da DF variam consideravelmente em frequência e gravidade entre os pacientes (CARVALHO DOS SANTOS *et al.*, 2012; GREEN e BARRAL, 2014). Neste trabalho também foi observada grande variabilidade para os parâmetros hematológicos, laboratoriais e de estresse oxidativo. Tanto os fatores genéticos como os adquiridos contribuem para a variação clínica observada, sendo que o fator adquirido mais importante está correlacionado às condições socioeconômicas dos pacientes (FERNANDES *et al.*, 2015).

## 6.1 TRATAMENTO COM HIDROXIUREIA

A hidroxiureia é uma desoxirribonucleotídeo redutase, de ação citotóxica rápida, que induz um estado de "estresse eritropoiético". Este medicamento induz uma leve e intermitente toxicidade na medula, que responde à lesão farmacológica diária, aprimorando a eritropoiese e aumentando a produção de HbF, efeitos que diminuem a polimerização da HbS e a hemólise (TORRES *et al.*, 2012; GREEN e BARRAL, 2014).

A hidroxiureia ainda é o único medicamento com comprovado efeito na melhora da DF (ALMEIDA *et al.*, 2012; GREEN e BARRAL, 2014). Apesar de seu uso ainda não estar liberado pelo FDA para crianças, após vários anos de estudos, órgãos de saúde internacionais recomendam seu uso, devido à sua eficácia e segurança (KINNEY *et al.*, 1999; THORNBURG *et al.*, 2009; MCGANN e WARE, 2011). No Brasil, pela portaria 27 de 12 de junho de 2013, a hidroxiureia foi incorporada ao SUS, sendo indicada para crianças com DF a partir de dois anos de idade (BRASIL, 2013). Nos EUA, novas diretrizes já recomendam que as crianças sejam tratadas antes dos nove meses de idade, independentemente da frequência ou gravidade das complicações clínicas (MCGANN *et al.*, 2014).

Sendo assim, este estudo iniciado no ano de 2013 incluiu todas as crianças com DF em acompanhamento no Ambulatório de Hematopediatria do HC/UFPR, que estavam dentro de critérios clínicos avaliados para o início do tratamento com hidroxiureia. Para a maioria das crianças atendidas foram

prescritas doses de 500 mg de hidroxiureia ao dia, com exceção de 3 pacientes que tinham 14 anos, para os quais a posologia indicada foi de 1000 mg/dia. Vários autores reportam que a terapia a longo prazo em doses de 20 a 35 mg/kg/dia, é bem tolerada por pacientes pediátricos (KINNEY, 1999; SILVA e SHIMAUTI, 2006).

A hidroxiureia é um medicamento supressor hematopoiético, e seu uso requer monitorização clínica constante, com consultas e exames laboratoriais frequentes (MOORE *et al.*, 2000; BANDEIRA *et al.*, 2004). Para os pacientes atendidos no Ambulatório de Hematopediatria do HC/UFPR são agendadas consultas a cada três meses. No entanto, durante a realização deste trabalho foi observada uma alta frequência de faltas às visitas. Além disso, pela análise dos prontuários dos pacientes em acompanhamento neste estudo, verificou-se que 11 dos 41 pacientes inicialmente incluídos (mais de 25%), certamente não aderiram ao tratamento prescrito. Essas dificuldades resultaram em diferenças no número de pacientes avaliados em cada fase deste estudo, visto que nem todos compareceram às consultas nos tempos determinados.

Apesar de inúmeros estudos destacarem todos os benefícios da hidroxiureia e vários órgãos de saúde recomendarem seu uso, Charache *et al.* (1992) já mencionaram que a adesão do paciente é fundamental para resultados positivos. A questão da adesão ao tratamento é complexa e de difícil mensuração (HEENEY e WARE, 2008; THORNBURG *et al.*, 2009; VOSKARIDOU *et al.*, 2010).

Em diversos estudos (MCGANN *et al.*, 2013; PEREIRA *et al.*, 2013; FERENANDES *et al.*, 2015) têm sido relatadas várias barreiras para a utilização da hidroxiureia em crianças, e seu uso foi positivamente correlacionado com o conhecimento dos pais sobre a doença e os efeitos benéficos do medicamento. Um único levantamento de pais de pacientes com DF revelou que a maioria acreditava que os efeitos da doença diminuiriam ao longo do tempo e não afetariam os objetivos ou a sobrevivência das crianças. Estas percepções terão de ser alteradas para que as famílias obtenham os benefícios a longo prazo do tratamento (GREEN e BARRAL, 2014).

Além disso, os pacientes com DF, em geral, pertencem a uma população carente que enfrenta problemas raciais, culturais, emocionais, psicológicos e socioeconômicos (FELIX *et al.*, 2010; THOMPSON *et al.*, 2010).

O baixo nível socioeconômico dos pacientes já foi demonstrado em vários países como Inglaterra (ALJUBURI, *et al.*, 2013), Estados Unidos (MCCAVIT *et al.*, 2011) e Brasil (FELIX *et al.*, 2010; SANTOS e GOMES NETO, 2013; FERNANDES *et al.*, 2015).

Pessoas em situação socioeconômica vulnerável estão mais expostas aos fatores sociais determinantes da doença, o que pode levar ao agravamento da saúde geral dos pacientes e os torna mais dependentes de programas governamentais para benefícios financeiros e de saúde. Estas condições vulneráveis também influenciam a adesão ao tratamento recomendado pelos médicos (MCGANN *et al.*, 2013). Entre as maiores dificuldades descritas pelos pais destaca-se a dificuldade na aquisição do medicamento, além do transporte para ir ao centro de referência. Estas mesmas dificuldades foram descritas por Pereira *et al.* (2013) e Fernandes *et al.*, (2015).

Obviamente, restam vários obstáculos que devem ser superados para atingir o uso difundido e adequado do tratamento. Isto inclui educação adequada dos profissionais de saúde e das famílias, melhoria das políticas públicas para esses indivíduos, disponibilidade de centros de atendimento com infraestrutura adequada, apoio financeiro integral do Ministério da Saúde, além de aconselhamento psicossocial (FERNANDES *et al.*, 2015; WANG, 2015).

Um incentivo ao apoio do governo para o uso expandido da hidroxiureia seria o fato de que os custos relacionados à gestão ambulatorial, adicionados ao valor do próprio medicamento são mais do que compensados pela redução nas crises de dor, internações e outras terapias sintomáticas (MOORE *et al.*, 2000; BANDEIRA *et al.*, 2004; WANG, 2015).

Clinicamente, a hidroxiureia tem reduzido as crises dolorosas, a síndrome torácica, os AVC, as frequências de internações, as necessidades transfusionais e, a longo prazo, as lesões em órgãos alvo. Tudo isto, sem dúvida, contribui com a melhoria da qualidade de vida (MOORE *et al.*, 2000; SUMOZA *et al.*, 2002; BANDEIRA *et al.*, 2004; COVAS *et al.*, 2004; SILVA e SHIMAUTI, 2006; ALMEIDA *et al.*, 2012; GREEN e BARRAL, 2014).

## 6.2 PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

### 6.2.1 Série Vermelha

O grupo controle foi constituído de crianças sem alterações hematológicas, participantes de projeto de extensão da UFPR. Como critérios de normalidade foram avaliados os parâmetros hematológicos por análise do hemograma e a presença de hemoglobinopatias por eletroforese de hemoglobinas. As amostras que apresentaram qualquer alteração nestes exames foram excluídas do grupo controle. Os dados foram analisados por gênero (Tabela 1), observando-se diferenças em alguns parâmetros da série vermelha, como já descrito para adultos (VALDATI *et al.*, 2011).

Comparando os parâmetros hematológicos dos pacientes com DF com o grupo controle, observaram-se valores reduzidos para contagem de eritrócitos, concentração de hemoglobina, hematócrito e CHCM, refletindo o estado de anemia crônica causado pela hemólise repetitiva, conforme já descrito na literatura (WANG, 2004; RUSANOVA *et al.*, 2010; TORRES *et al.*, 2012). O valor do VCM foi significativamente maior nos pacientes e não houve diferença significativa na HCM.

Na DF, a anemia é direta e facilmente avaliada pela concentração da hemoglobina. Este parâmetro é biomarcador útil, indicando a necessidade de transfusão sanguínea. Concentrações baixas de hemoglobina geralmente estão ligadas a mau prognóstico da doença, com o aumento do risco das complicações clínicas (REES e GIBSON, 2011). Nos pacientes incluídos neste trabalho o valor médio de hemoglobina antes do tratamento com hidroxiureia foi de 8,9 g/dl (7,0 – 9,7 g/dl) e o hematócrito de 26,7% (21,0 – 29,1%), ambos mais de 30% menores que os encontrados no grupo controle (13,5 g/dl; 12,9 – 14,0 g/dl e 39,4%; 37,2 – 40,4%, respectivamente) (Tabela 2).

Comparando os valores hematológicos dos pacientes, observou-se redução significativa nos níveis da Hb total antes e depois do primeiro ano de vida (Gráfico 2). Durante a vida fetal e nos primeiros meses após o nascimento, a falta de expressão do fenótipo HbS é explicada pela produção de HbF, suficiente para limitar os efeitos da falcização. A partir do sexto mês de vida,

quando a quantidade de HbF diminui, as manifestações clínicas da doença tornam-se mais evidentes (LERVOLINO *et al.*, 2011).

Após o tratamento dos pacientes com DF com hidroxiureia, têm sido descritos aumentos nos níveis de Hb total e de VCM, além de redução do número de leucócitos e plaquetas, em relação aos valores basais (FERSTER *et al.*, 1996; SUMOZA *et al.*, 2002; BANDEIRA *et al.*, 2004; COVAS *et al.*, 2004; SILVA e SHIMAUTI, 2006; THORNBURG *et al.*, 2009; WARE *et al.*, 2011; ALMEIDA *et al.*, 2012; TORRES *et al.*, 2012; GREEN e BARRAL, 2014).

Neste estudo, não foi observado aumento na hemoglobina total, porém houve aumento significativo dos valores médios do VCM, o que pode ser interpretado como efeito benéfico do tratamento (Gráfico 3) (CHARACHE, *et al.*, 1995; THOMPSON *et al.*, 2010; VOSKARIDOU *et al.*, 2010; MCGANN e WARE, 2011; BELINI JUNIOR *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2013).

Charache *et al.* (1992) foram surpreendidos com o aumento do VCM durante a terapia com hidroxiureia, sugerindo que as células tornaram-se mais discoides durante o tratamento, favorecendo a diminuição da hemólise. Covas *et al.*, (2004) relataram que o aumento do VCM poderia resultar da hidratação das células causada pela hidroxiureia, talvez pela modulação do transporte de potássio/cloro, podendo ter um efeito direto na redução da adesão das células falciformes.

#### 6.2.2 Leucócitos e Plaquetas

Em vários estudos tem sido relatado que os pacientes com DF apresentam um estado inflamatório crônico, com contagens de leucócitos e iniciadores da coagulação elevados (ASLAN e FREEMAN, 2007; REES e GIBSON, 2011). Os pacientes com DF apresentaram contagens elevadas de leucócitos ( $13,8 \times 10^3$ ;  $9,1-16,8 \times 10^3/\text{mm}^3$ ) e plaquetas ( $458,5 \times 10^3$ ;  $285,0-545,0 \times 10^3/\text{mm}^3$ ), valores, em geral, duas vezes a média do grupo controle (Tabela 2).

Um dos efeitos laboratoriais relatados para o tratamento com hidroxiureia é a redução das contagens de leucócitos e plaquetas (SILVA e SHIMAUTI, 2006; THORNBURG *et al.*, 2009; ALMEIDA *et al.*, 2012; TORRES *et al.*, 2012; GREEN e BARRAL, 2014). Neste trabalho, não foi observada



redução na contagem de plaquetas entre os pacientes, com grande variabilidade de contagem para este parâmetro (Gráfico 5). Comportamento semelhante para a contagem de plaquetas foi descrito por Covas *et al.* (2004).

Em relação à contagem de leucócitos, houve redução significativa após a introdução do tratamento com HU (Gráfico 4), sugerindo possível correlação da concentração aumentada da HbF como agente anti-inflamatório (DASGUPTA *et al.*, 2010). Os valores iniciais médios de  $12.700/\text{mm}^3$ , diminuíram para  $9.700/\text{mm}^3$ ,  $9.200/\text{mm}^3$  e  $8.200/\text{mm}^3$ , após 3, 6 e 9 meses ou tempos maiores de tratamento, respectivamente. Rees e Gibson (2011) correlacionaram a diminuição da contagem de leucócitos durante o tratamento com HU com redução na frequência das crises de dor em pacientes com DF.

### 6.2.3 Reticulócitos

Devido à meia-vida curta dos drepanócitos, em pacientes com DF há rápida rotatividade de eritrócitos na circulação sanguínea, resultando em aumento da concentração de reticulócitos (CHIRICO e PIALOUX, 2012).

Em vários estudos tem sido relatado que os pacientes com DF apresentam contagens aumentadas de reticulócitos quando comparados a indivíduos saudáveis (RUSANOVA *et al.*, 2010; REES e GIBSON, 2011; TORRES *et al.*, 2012). As contagens de reticulócitos não foram determinadas nas amostras do grupo controle porque o equipamento disponível no laboratório não realizava contagem automatizada deste parâmetro, metodologia que foi utilizada para a dosagem nas amostras dos pacientes, cujos resultados foram obtidos dos prontuários. Os valores médios de reticulócitos nos pacientes com DF foram de 10,3% (4,8 – 17,1%) (BELISÁRIO *et al.*, 2010; CARVALHO DOS SANTOS *et al.*, 2012), acima dos valores de normalidade, que oscilam entre 0,5 e 2,3% (FAILACE *et al.*, 2009).

Em vários trabalhos, foi relatado que a hidroxiureia é capaz de reduzir as contagens de reticulócitos (FERSTER *et al.*, 1996; SUMOZA *et al.*, 2002; BANDEIRA *et al.*, 2004; COVAS *et al.*, 2004; SILVA e SHIMAUTI, 2006; THORNBURG *et al.*, 2009; ALMEIDA *et al.*, 2012; TORRES *et al.*, 2012; GREEN e BARRAL, 2014). No entanto, esta redução não foi observada nos

pacientes pediátricos em acompanhamento neste estudo (Gráfico 6), com grande variabilidade entre os pacientes para estes resultados.

#### 6.2.4 Hemoglobina Fetal

A HbF é composta por duas cadeias polipeptídicas  $\alpha$  e duas cadeias  $\gamma$  e é considerada um modulador das características clínicas e hematológicas da DF porque, conforme foi demonstrado, não interage com a HbS, diminuindo a intensidade do processo de polimerização. O efeito contra o processo de polimerização da HbF está relacionado com a presença dos resíduos de glicina na posição 87 ( $\gamma 87$ ) e do ácido aspártico na posição 80 ( $\gamma 80$ ), na cadeia  $\gamma$  (AKINSHEYE *et al.*, 2011).

Tem sido relatado que os pacientes com DF apresentam valores aumentados de HbF (RUSANOVA *et al.*, 2010; REES e GIBSON, 2011), variando de 1 a 30% (TORRES *et al.*, 2012). Neste trabalho, os valores médios iniciais foram de 7,9%, variando de 2,0 a 30,4%.

Sugere-se que, após o tratamento com hidroxiureia, 15 a 20% de HbF sejam necessários para um benefício clínico, mas qualquer aumento acima de 4% pode ser benéfico (CHARACHE, *et al.*, 1995). A HbF geralmente aumenta de 8 a 18% em relação aos níveis basais (GREEN e BARRAL, 2014). Neste trabalho a concentração de HbF aumentou cerca de 60% após o início do tratamento (média de 12,9%; 5,4 – 20,4%) (Gráfico 7). Ferster *et al.* (1996) demonstraram uma elevação de  $4,8 \pm 4,6\%$  para  $15,3 \pm 11,3\%$  em 25 crianças com DF tratadas com hidroxiureia, Bandeira *et al.* (2004) observaram aumento de  $12,2 \pm 6,7\%$  para  $17,6 \pm 6,0\%$  de HbF em 6 crianças e 13 adultos com DF, enquanto Torres *et al.* (2012), estudando 33 pacientes adultos com DF, observaram elevações médias na HbF de  $6,5 \pm 4,2$  para  $11,9 \pm 6,9\%$ .

#### 6.3 PARÂMETROS LABORATORIAIS

O fato dos pacientes com DF necessitarem de acompanhamento médico constante, inclui a realização de exames laboratoriais frequentes. Analisando-se os resultados dos parâmetros laboratoriais obtidos dos prontuários das crianças incluídas neste trabalho, observou-se elevação dos níveis de

bilirrubinas, aspartato aminotransferase e LDH em comparação com valores de normalidade, antes do tratamento com hidroxiureia. Estas alterações podem ser explicadas pelo estado de hemólise crônica nos pacientes (KINNEY *et al.*, 1999).

Segundo Rees e Gibson (2011), a LDH sérica tem sido associada com outros parâmetros clínicos e laboratoriais na DF. Não está claro, no entanto, se a LDH reflete um aspecto específico da patologia ou se é apenas um de uma série de fatores estreitamente relacionados entre si, associados com a anemia. Em vários trabalhos, tem sido relatadas reduções nos níveis séricos de bilirrubina e de LDH, após o tratamento com hidroxiureia (FERSTER *et al.*, 1996; KINNEY *et al.*, 1999; THORNBURG *et al.*, 2009; WARE *et al.*, 2011; STROUSE e HEENEY, 2012; TORRES *et al.* 2012). Neste trabalho as reduções foram significativas para os níveis de LDH, sugerindo diminuição da taxa de hemólise, esperada pelo aumento na HbF, que inibe a polimerização da HbS.

Os parâmetros hematológicos e laboratoriais também podem ser utilizados para avaliação da segurança do tratamento. Têm sido relatadas como efeitos adversos do tratamento com hidroxiureia, raramente, mielotoxicidade, evidenciada por plaquetopenia (inferior a  $100.000/\text{mm}^3$ ) e leucopenia (inferior a  $5.000/\text{mm}^3$ ), e toxicidade renal ou hepática (CHARACHE *et al.*, 1995; HEENEY e WARE, 2008; STEINBERG *et al.*, 2010; VOSKARIDOU *et al.*, 2010; MCGANN e WARE, 2011). Estes efeitos são reversíveis após suspensão do medicamento (BRAUNWALD *et al.*, 2013). Neste trabalho, no entanto, não foram observadas trombocitopenia, leucopenia ou aumentos significativos nos marcadores renais e hepáticos (Tabela 3), durante o período de acompanhamento. Dados semelhantes foram relatados por Bandeira *et al.* (2004) e Strouse e Heeney (2012).

#### 6.4. PARÂMETROS RELACIONADOS AO ESTRESSE OXIDATIVO

A DF está emergindo como um importante modelo de estresse oxidativo (EL-GHAMRAWYA *et al.*, 2014), pois os eritrócitos contendo HbS geram espontaneamente duas vezes mais ERO que os eritrócitos normais (MAGALHÃES, 2011). Em vários trabalhos têm sido demonstrado que seu

repetitivo processo de polimerização e despolimerização pode gerar pró-oxidantes (RUSANOVA *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2013), o que tem sido descrito como um evento chave para danos oxidativos nestes pacientes (ADESANNOYE *et al.*, 2012).

O monitoramento do estresse oxidativo envolve diferentes parâmetros pró-oxidantes e antioxidantes (MAGALHÃES, 2011). Biomarcadores significativos podem ter um papel importante na gestão da DF, incluindo o diagnóstico precoce de complicações, a detecção de danos crônicos em órgãos, a identificação de indivíduos em risco de um curso clínico grave e o monitoramento da resposta ao tratamento (RUSANOVA *et al.*, 2010; REES e GIBSON, 2011; TORRES *et al.*, 2012).

Neste trabalho, foram determinados oito parâmetros relacionados ao estresse oxidativo, em eritrócitos isolados do sangue periférico de pacientes com DF. Entre eles os indicadores de oxidação meta-hemoglobina, porcentagens de hemólise, TBARS e ERO, além dos indicadores de antioxidação GSH, CAT, SOD e G6-PD.

Como existe muita dificuldade na obtenção de valores de referência para os parâmetros de estresse oxidativo na literatura, especialmente valores pediátricos, todos os parâmetros foram também determinados em crianças consideradas normais, para efeito de comparação. Foram excluídas do grupo controle crianças que apresentaram qualquer alteração hematológica no hemograma ou na eletroforese de hemoglobinas.

Cada parâmetro foi determinado em 100 amostras de crianças normais, visto que o volume de sangue não foi suficiente para a dosagem de todos os parâmetros em todas as amostras. Os dados foram apresentados separados por gênero, mostrando diferenças significativas apenas para as determinações de porcentagens de hemólise (Tabela 4). Esses resultados foram previamente publicados (HERMANN *et al.*, 2015 – Anexo IV).

Com relação aos parâmetros de estresse oxidativo nos pacientes, em comparação aos do grupo controle, não foram observadas diferenças significantes para os antioxidantes GSH, SOD e CAT (Tabela 5). Os parâmetros meta-hemoglobina, TBARS, porcentagens de hemólise, G6-PD e ERO foram significativamente maiores nos pacientes em comparação com o

controle (Tabela 5), comprovando que o estresse oxidativo é evidente em crianças com DF (EL-GHAMRAWYA *et al.*, 2014).

A herança do gene para a HbS pode ser combinada com as de outras hemoglobinas estruturalmente anormais, tais como a HbC, e também com anormalidades da produção de hemoglobina, como a beta-talassemia (OWUSU-OFORI e HIRST, 2013). Os resultados obtidos para os parâmetros relacionados ao estresse oxidativo nos pacientes com DF foram analisados entre as diferentes associações da doença, diagnosticadas nos pacientes incluídos neste estudo. Apesar da anemia falciforme (HbSS) ser descrita como a forma mais grave (RAJ e BERTOLONE, 2010), neste trabalho não foram observadas diferenças significativas nestes parâmetros entre os pacientes com HbSS, HbSC e HbS associada à  $\beta$  talassemia (Tabela 6).

Um dos objetivos do presente trabalho foi estabelecer uma relação entre os haplótipos do gene da  $\beta$  globina dos pacientes com DF com os parâmetros relacionados ao estresse oxidativo. Os haplótipos SEN, BEN, BAN, CAM e Árabe-Indiano são denominados de acordo com a região geográfica onde são mais encontrados ou o grupo étnico onde foram originalmente descobertos (SILVA e SHIMAUTI, 2006). A importância dos haplótipos da mutação  $\beta^s$  na evolução clínica da DF foi determinada por observações quanto ao surgimento e a intensidade das complicações clínicas dos pacientes, sugerindo melhores prognósticos para os pacientes com haplótipo SEN e Árabe-Indiano e pior evolução para os pacientes com os haplótipos BEN e BAN (CARVALHO DOS SANTOS *et al.*, 2012).

Em outro estudo realizado nos pacientes com DF atendidos no Ambulatório de Hematopediatria do HC/UFPR foram determinados os haplótipos da  $\beta$  globina (WATANABE, 2015), tendo sido obtidos resultados para 36 dos pacientes incluídos neste estudo. Dentre estes, foi observada a existência de pacientes BAN (24 casos), BEN/BAN (6 casos) e BEN (6 casos).

Não foram observadas diferenças significativas nos parâmetros relacionados ao estresse oxidativo entre os diferentes haplótipos (Tabela 7), possivelmente porque todos os pacientes apresentaram haplótipos associados a maior gravidade da doença, não havendo nenhum paciente com haplótipo associado a cursos clínicos mais leves para comparação. Resultados semelhantes foram descritos por Henneberg (2013) em pacientes adultos.

Entretanto, Rusanova *et al.* (2010) demonstraram que pacientes pediátricos com os haplótipos SEN ou Árabe-Indiano apresentaram parâmetros com menor propensão ao estresse oxidativo em comparação aos pacientes com haplótipos BEN e BAN.

#### 6.4.1 Determinação de Meta-hemoglobina

A hemoglobina oxigenada, ou oxiemoglobina, se caracteriza pelo estado reduzido ou ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) do ferro inserido no grupo heme. Entretanto, as contínuas reações metabólicas do nosso organismo liberam substâncias capazes de oxidar o ferro para o estado férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ), produzindo meta-hemoglobina (NAOUM *et al.*, 2004).

Em um modelo bioquímico da hemólise, foi proposto que a conversão da hemoglobina para meta-hemoglobina inicia um processo de sensibilização, com aumento na produção de ERO no interior do eritrócito, estresse oxidativo e mudanças no citoesqueleto da membrana eritrocitária. A partir desta fase, o eritrócito torna-se mais vulnerável para eliminação pelo sistema imune, com consequente hemólise. Há liberação de hemoglobina e meta-hemoglobina, que iniciam outro ciclo para amplificar o processo hemolítico. Desta forma, a determinação de meta-hemoglobina é um mediador na formação de ERO, importante para a hemólise (BALAJI e TRIVEDI, 2012).

Naoum *et al.* (2004) descreveram uma técnica espectrofotométrica para detecção quantitativa de meta-hemoglobina em relação à oxiemoglobina, por meio da absorção em comprimentos de onda específicos, sem interferência química e sem risco tóxico. Esta técnica, extremamente simples e rápida, foi adaptada para pequenos volumes de sangue e mostrou-se bem reprodutível. Mesmo assim, poucos trabalhos que avaliaram o estresse oxidativo na DF citam a determinação da meta-hemoglobina.

Os resultados obtidos demonstraram uma concentração de meta-hemoglobina mais que o dobro nos pacientes em relação ao grupo controle (Tabela 5 e Gráfico 8). Resultados semelhantes já foram descritos por Chaves *et al.* (2008), Hanson *et al.* (2011), Furman *et al.* (2012) e Henneberg (2013), em adultos com DF.

Avaliando-se a meta-hemoglobina nas crianças antes e durante o tratamento com hidroxiureia, observou-se redução significativa nos valores após o início do uso do medicamento, não havendo diferença entre os diferentes tempos de tratamento (Tabela 8 e Gráfico 9), demonstrando um possível efeito antioxidante da hidroxiureia.

#### 6.4.2 Concentrações de GSH

A função fisiológica da GSH está implicada na primeira linha de defesa celular contra hidroperóxidos e ERO (BARREIROS, *et al.*, 2006). A depleção da GSH aumenta a sensibilidade do eritrócito ao estresse oxidativo e diminui a capacidade antioxidante desta célula, o que tem sido associado à patogênese da DF (MAGALHÃES, 2011). Em alguns estudos foi sugerido que o excesso de pró-oxidante pode levar ao consumo ou inativação de elementos de proteção (SILVA *et al.*, 2013).

Por isso, os pacientes com DF tendem a apresentar níveis de GSH significativamente menores em comparação a indivíduos normais (ASLAN *et al.*, 2000; CHAVES *et al.*, 2008; GIZI *et al.* 2011). No entanto, Silva *et al.* (2011) e Torres *et al.* (2012) observaram níveis de GSH maiores nos pacientes com DF em relação aos seus respectivos grupos controle, sugerindo uma resposta ao estresse oxidativo crônico, ressaltando que os níveis de GSH também podem ser influenciados pela dieta, por exemplo, por deficiências dos precursores de aminoácidos para sua síntese.

Nos resultados obtidos neste trabalho, não foram observadas diferenças significativas entre os valores basais de GSH nas crianças com DF em comparação com crianças normais (Tabela 5 e Gráfico 10).

Com o intuito de avaliar uma possível proteção da hidroxiureia contra o estresse oxidativo crônico, a determinação de GSH foi também realizada após a incubação de suspensões de eritrócitos dos pacientes com o agente oxidante *tert*-butilhidroperóxido (*t*BHP), um peróxido orgânico amplamente usado como pró-oxidante em vários estudos de estresse oxidativo (AJUWON *et al.*, 2013). Ocorre produção de radicais alcóxil (*t*BuO•) e alquilperóxil (*t*BuOO•), que apresentam papel fundamental no processo de oxidação. Os estoques celulares de GSH são consumidos, aumenta a peroxidação lipídica, alterando a

integridade da membrana e causando hemólise nos eritrócitos, dependente de tempo e concentração (ADESANOYE *et al.*, 2012).

A indução do estresse oxidativo por incubação com tBHP resultou em um decréscimo substancial no conteúdo de GSH nos eritrócitos, conforme já descrito por Fatima *et al.* (2013). Em alguns trabalhos, foi sugerido um efeito antioxidante da hidroxiureia sobre os níveis de glutathione, comparando-se pacientes com DF recebendo o medicamento com outros sem tratamento (TEIXEIRA NETO *et al.*, 2011; EL-GHAMRAWYA *et al.*, 2014). Neste trabalho, a GSH foi determinada nos mesmos pacientes antes e depois do início do tratamento, não havendo diferenças significativas nos resultados, tanto nos níveis basais, quanto após incubação com o agente oxidante, não havendo efeito protetor da hidroxiureia (Tabela 8 e Gráfico 11).

#### 6.4.3 Concentrações de TBARS

As substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) referem-se à quantificação indireta do malondialdeído (MDA) e de outros aldeídos resultantes da peroxidação lipídica, e são consideradas marcadores do estímulo pró-oxidante, pois medem subprodutos de destruição da membrana celular (BELINI JUNIOR *et al.*, 2012; TORRES *et al.*, 2012). O MDA é um produto secundário, derivado da  $\beta$ -ruptura de ácidos graxos, como os ácidos linoleico e araquidônico, e que pode ser medido livre, utilizando-se o ácido tiobarbitúrico (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

Os eritrócitos, altamente suscetíveis a ataques de ERO, apresentam aumento na produção de TBARS, especialmente MDA, capaz de ligar-se a fosfolipídeos e proteínas de eritrócitos, prejudicando uma variedade de funções relacionadas com a membrana, o que acaba por aumentar a hemólise (ADESANOYE *et al.*, 2012).

Neste trabalho, foram obtidos valores de TBARS 68% maiores nos pacientes em relação ao grupo controle (Tabela 5 e Gráfico 12). Níveis aumentados de peroxidação lipídica têm sido extensivamente descritos na DF (RUSANOVA *et al.*, 2010; GIZI *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2011; EL-GHAMRAWYA *et al.*, 2014), porque os eritrócitos contendo HbS contêm



mais lipídeos oxidados e estão mais suscetíveis que os eritrócitos normais (SILVA *et al.*, 2013).

Após o início do tratamento com hidroxíureia foi observada uma redução significativa nos valores de TBARS, também demonstrando seu efeito antioxidante (Tabela 8 e Gráfico 13), como já descrito por Dasgupta *et al.* (2010), Silva *et al.* (2011) e Torres *et al.* (2012).

A incubação de suspensões de eritrócitos com solução de tBHP, aumentou significativamente a peroxidação lipídica, conforme já descrito por Fatima *et al.* (2013). Nestas condições de elevado estresse oxidativo, a hidroxíureia não foi capaz de proteger os eritrócitos (Tabela 8 e Figura 30).

#### 6.4.4 Determinações da Atividade Enzimática da G6-PD

A glucose-6-fosfato desidrogenase (G6-PD) catalisa o primeiro passo da via das pentoses fosfato, convertendo glucose 6-fosfato em 6-fosfogluconolactona, produzindo NADPH durante esta conversão. Esta via é a única fonte para a produção do NADPH nos eritrócitos, necessário para a geração de glutathiona reduzida (GSH) a partir de sua forma oxidada (GSSG) e posterior manutenção dos estoques intracelulares de GSH. A G6-PD e o NADPH são fatores chave para a proteção dos eritrócitos contra danos oxidativos. Nesta reação, a GSH é oxidada e a glutathiona redutase (GR) a regenera utilizando NADPH. O NADPH é oxidado e a G6-PD é necessária para produzir NADPH reduzido novamente (URSINI *et al.*, 1997; FARHUD e YAZDANPANA, 2008). Portanto, esta é uma importante enzima relacionada com a defesa antioxidante nos eritrócitos. A deficiência de G6-PD tem sido associada com o aumento do estresse oxidativo (SILVA *et al.*, 2013).

A possível relação entre a deficiência de G6-PD e a doença falciforme foi alvo de vários estudos (MARTI *et al.*, 1965; LEWIS *et al.*, 1966; LUZZATTO e ALLAN, 1968; PIOMELLI *et al.*, 1972). Mas em estudos da atividade da enzima na anemia falciforme, sua influência no curso da doença ainda é controversa (SILVA *et al.*, 2013).

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram atividade da G6-PD significativamente superior nos pacientes com DF em relação ao grupo controle (Tabela 5 e Gráfico 14). Resultados semelhantes foram descritos por

Henneberg (2013), em pacientes adultos com DF. Uma possível explicação para esta elevação nos valores da atividade enzimática nos pacientes poderia se basear na elevada concentração de reticulócitos encontrada no sangue periférico destes pacientes, como consequência da hemólise crônica. A atividade da G6-PD cai exponencialmente com o amadurecimento dos eritrócitos e os reticulócitos apresentam valores de atividade desta enzima cerca de duas vezes o valor dos eritrócitos maduros (LUKENS, 1998).

Outra explicação para este aumento da atividade da G6-PD seria devido à necessidade da presença da enzima para regenerar a GSH e manter a integridade celular, uma vez que os pacientes apresentam tendência à exacerbação do processo oxidativo, de acordo com o que foi descrito por Santos (2008) em pacientes com  $\beta$ -talassemia.

Após o início do tratamento com hidroxiureia não foram observadas diferenças significativas na média das determinações da atividade enzimática da G6-PD (Tabela 8 e Gráfico 15).

#### 6.4.5 Determinações das Porcentagens de Hemólise

Os eritrócitos contendo HbS frequentemente são rompidos durante o seu transporte nos vasos sanguíneos e os pacientes com DF têm níveis elevados de hemólise, em comparação com indivíduos saudáveis. Este aumento da taxa de hemólise constitui-se o início de muitas das complicações subsequentes da doença (CHIRICO e PIALOUX, 2012). Além disso, o aumentado estresse oxidativo intra e extra eritrocítico na DF induz instabilidade na membrana com alta exposição de fosfolipídeos, que contribui para a hemólise intravascular acelerada (SILVA *et al.*, 2013). Hemólise extravascular também ocorre devido ao sequestro esplênico, que ocorre quando os eritrócitos contendo HbS ficam retidos no baço (OWUSU-OFORI e HIRST, 2013).

Com o intuito de avaliar o efeito da hidroxiureia sobre a hemólise dos eritrócitos nos pacientes com DF, foi utilizado o agente oxidante dicloridrato de 2,2'-azobis (2-metil-propionamida) (AAPH), pois foi verificado que o agente oxidante tBHP não induzia hemólise em extensão considerável nos eritrócitos. NIKI *et al.* (1988) e KONDO *et al.* (1997) verificaram que o AAPH induz hemólise pela geração de radicais aquosos peróxido, por decomposição térmica

aeróbica e a extensão da hemólise é diretamente proporcional à quantidade dos radicais formados.

Como já descrito em trabalho anterior (HENNEBERG, 2013), existe uma diferença de resistência osmótica entre eritrócitos normais e falciformes, sendo estes últimos resistentes à hemólise pela água, considerada como 100% nas técnicas descritas na literatura (BANERJEE *et al.*, 2008). Neste trabalho as porcentagens de hemólise foram calculadas em função da hemólise produzida pela suspensão de 200 mmol/l de AAPH, considerada como 100%, por produzir absorvância próxima da produzida por suspensões de eritrócitos normais incubados com água.

A extensão da hemólise nos eritrócitos dos pacientes com DF, em relação aos eritrócitos do grupo controle foi significativamente maior, tanto no nível basal como após oxidação com as diferentes concentrações do AAPH (Tabela 5 e Gráfico 16). Esta aumentada taxa de hemólise em eritrócitos contendo HbS também foi descrita por Chirico e Pialoux (2012). Dasgupta *et al.* (2010) observaram resultados semelhantes em modelos animais, e Chaves *et al.* (2008) e Henneberg (2013) em pacientes adultos.

Avaliando-se marcadores secundários de hemólise, tem sido relatado em alguns trabalhos que a hidroxíureia é capaz de reduzir a lise nos eritrócitos dos pacientes com DF (CHIRICO e PIALOUX, 2012; SILVA *et al.*, 2013). Com avaliação direta da hemólise, este efeito não foi observado nos eritrócitos dos pacientes pediátricos no presente estudo (Tabela 8 e Gráfico 17).

#### 6.4.6 Determinações da Atividade Enzimática da Catalase

A catalase é uma conhecida enzima antioxidante, encontrada em quase todos os organismos que são expostos ao oxigênio (NAZIROĞLU, 2012). Como a função primordial dos eritrócitos é o transporte de oxigênio, estas células são continuamente expostas a fontes endógenas e exógenas de ERO, que podem danificar sua estrutura e prejudicar sua função. Para minimizar o efeito do estresse oxidativo resultante, os eritrócitos possuem um extenso sistema antioxidante envolvendo enzimas como a catalase e a superóxido dismutase (MOHANTY *et al.*, 2014).

Em estudos que avaliaram a atividade da catalase na DF, os resultados têm sido controversos. Alguns autores têm mostrado atividade diminuída desta enzima em modelos animais (DASGUPTA *et al.*, 2010) e em pacientes com DF (ALSULTAN *et al.*, 2010), devido ao estresse oxidativo crônico. Em outros trabalhos foram descritos aumentos nos níveis de catalase em pacientes com DF, possivelmente devido ao efeito protetor para retirar  $H_2O_2$ . Outra hipótese é que os níveis elevados de enzimas antioxidantes em eritrócitos de pacientes com DF possam ser consequência do maior teor de reticulócitos no sangue periférico dos pacientes (SILVA *et al.*, 2013).

No entanto, os resultados obtidos neste trabalho, em pacientes pediátricos com DF, estão de acordo com Manfredini *et al.* (2008) e Cho *et al.* (2010), pois não foi encontrada diferença significativa nos níveis da catalase quando comparados com indivíduos saudáveis (Tabela 5 e Gráfico 18), com grande variabilidade individual para os resultados da atividade da enzima.

Após o uso da hidroxiureia foram observadas reduções significativas na atividade da enzima, possivelmente devido à redução do estresse oxidativo (Tabela 8 e Gráfico 19). Resultados diferentes, porém, foram descritos por Dasgupta *et al.* (2010) e Silva *et al.* (2011) que relataram aumentos na atividade da catalase após o uso do medicamento. Resultados aparentemente contraditórios podem ocorrer devido a diferenças no grau de estresse oxidativo, gravidade da doença, polimorfismo da enzima, co-factor da enzima e nível de vitaminas antioxidantes. A atividade enzimática aumenta inicialmente em resposta à produção de ERO. As reações subsequentes e o esgotamento concomitante dos co-factores enzimáticos e anti-oxidantes não enzimáticos, conduzem a um declínio na atividade. Redução na atividade da enzima parece ocorrer devido à diminuição do estresse oxidativo causado pelo efeito antioxidante da hidroxiureia (DAAK *et al.*, 2013).

#### 6.4.7 Determinações da Atividade Enzimática da Superóxido Dismutase

A superóxido-dismutase (Cu/Zn SOD) representa a primeira linha de defesa antioxidante contra ERO geradas pelo processo de respiração aeróbica e, entre organismos eucarióticos, é a única enzima capaz de eliminar ânions superóxido, convertendo-os em  $H_2O_2$  (VAN RAAMSDONK e HEKIMI, 2012).

Assim como a catalase, a Cu/Zn SOD constitui uma importante enzima do sistema antioxidante do eritrócito, capaz de metabolizar ERO, provenientes do excessivo estresse oxidativo (ZWIETEN *et al.*, 2014).

As determinações da atividade desta enzima também têm sido controversas em pacientes com DF. Em alguns estudos foi demonstrado aumento da atividade da SOD (GIZI *et al.*, 2011), o que indica a capacidade da enzima para dismutar o ânion superóxido, uma resposta antioxidante em relação ao comprometimento do sistema glutatona. Porém, em outros trabalhos foi demonstrada diminuição da atividade (RUSANOVA *et al.*, 2010), relacionada com a gravidade da doença nos pacientes, em comparação com indivíduos normais (SILVA *et al.*, 2013).

Nos resultados encontrados no presente trabalho não foram observadas diferenças significativas nas atividades da SOD em pacientes pediátricos com DF em comparação com indivíduos saudáveis (Tabela 5 e Gráfico 20). Após o tratamento dos pacientes com hidroxiureia também não foi observada diferença significativa nos valores da atividade da SOD quando comparados aos valores antes do início do tratamento (Tabela 8 e Gráfico 21). Nestas determinações das atividades da SOD eritrocitária também foi observada grande variabilidade nos resultados individuais, possivelmente pelos mesmas razões dos resultados para a catalase, sendo diferenças no grau de estresse oxidativo, gravidade da doença, polimorfismo da enzima, co-factor da enzima e nível de vitaminas antioxidantes (DAAK *et al.*, 2013).

#### 6.4.8 Determinações das Espécies Reativas de Oxigênio

A DF é caracterizada por um estado de estresse oxidativo crônico causado pelo desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e a atividade de enzimas antioxidantes (CHO *et al.*, 2010). Embora a fisiopatologia central da doença esteja relacionada à polimerização da hemoglobina S e à falcização dos eritrócitos sob condições de desoxigenação, cada vez mais evidências sugerem que a DF representa um estado inflamatório caracterizado por maior ativação endotelial, aumentada produção de ERO e mais adesão celular aos tecidos (RUSANOVA *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2013).

A produção aumentada de ERO na DF é causada por mecanismos intrínsecos da doença, como o aumento da atividade de oxidases, auto-oxidação da HbS, liberação de ferro do heme e diminuição nos níveis de óxido nítrico, o que contribui diretamente para o fenômeno vaso-oclusivo (EL-GHAMRAWYA *et al.*, 2014).

Neste trabalho, a produção de ERO foi determinada diretamente no interior dos eritrócitos, utilizando-se uma técnica simples e rápida que utiliza sonda fluorescente. Nos eritrócitos de pacientes com DF foi observado aumento significativo na produção de ERO, em comparação com eritrócitos de indivíduos saudáveis (Tabela 5 e Gráfico 22). Resultado semelhante foi descrito por Gizi *et al.* (2011) em crianças e adultos com DF. Tem sido demonstrado que eritrócitos contendo HbS geram quantidades espontaneamente mais elevadas de superóxido, peróxido e radical hidroxila, através da reação de Haber-Weiss catalisada pelo ferro, em comparação com eritrócitos normais (DAAK *et al.*, 2013).

Após incubação das suspensões de eritrócitos com soluções do agente oxidante tBHP, foi observado que os níveis de ERO aumentaram substancialmente. O processo oxidativo induzido pelo tBHP nos eritrócitos ocorre pela rápida oxidação de GSH e pela reação do oxidante com a hemoglobina, produzindo ERO diretamente (DOMANSKI *et al.*, 2005).

Analisando-se o comportamento da produção de ERO após o início do tratamento com hidroxiureia, observou-se que houve diminuição significativa nos níveis basais em relação aos valores antes do medicamento (Tabela 8 e Gráfico 23), demonstrando que o aumento das taxas de HbF, como resultado do tratamento com hidroxiureia, limita a produção de ERO (NUR *et al.*, 2011). No entanto, essa mesma proteção não foi observada ao se induzir maiores níveis de oxidação com o tBHP.

## 6.5 ANÁLISE COMPARATIVA DOS RESULTADOS

Amplas variações interindividuais podem existir em relação à capacidade antioxidante, afetando a suscetibilidade individual contra reações oxidativas deletérias (ANDERSEN *et al.*, 1997). Tem sido demonstrado, em diversos estudos, que os eritrócitos de pacientes com DF, expostos a frequentes danos

oxidativos, apresentam parâmetros relacionados ao estresse oxidativo alterados (DASGUPTA *et al.*, 2010; GIZI *et al.*, 2011; NUR *et al.*, 2011; BELINI JUNIOR *et al.*, 2012; GEORGE *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2013;). Por este motivo, agentes com propriedades antioxidantes, que reduzam o estresse oxidativo e eventos fisiopatológicos podem constituir valioso meio de prevenir ou retardar o desenvolvimento de complicações na DF (SILVA *et al.*, 2013).

De acordo com Gizi *et al.* (2011), as hemoglobinopatias são caracterizadas por dano oxidativo devido ao aumento no consumo de oxigênio em repouso e hemoglobina livre pró-oxidativa na circulação, tendo sido demonstrados níveis alterados de biomarcadores oxidativos no plasma de pacientes com DF (NUR *et al.*, 2011).

No presente trabalho, foi possível comprovar resultados descritos na literatura no que diz respeito a alterações hematológicas e laboratoriais em pacientes pediátricos com DF, em relação a dados obtidos em grupos de indivíduos saudáveis, nesta mesma faixa etária. Além disso, foi possível comprovar o estado de estresse oxidativo exacerbado, com alterações significativas nas determinações de meta-hemoglobina, TBARS, hemólise e ERRO, em comparação com indivíduos saudáveis.

Na literatura sugere-se que a administração de hidroxiureia poderia ter um impacto significativo sobre o estresse oxidativo total na DF, por reduzir a vaso-oclusão e a hemólise (SILVA *et al.*, 2013).

Em análise dos resultados obtidos neste trabalho, após o início do tratamento com hidroxiureia, foi possível sugerir que houve adesão à medicação da maioria dos pacientes incluídos, o que pode ser demonstrado pelo aumento nas concentrações da HbF e do VCM, resultados conhecidos de sua ação farmacológica. Por outro lado, as reduções observadas em marcadores de oxidação como meta-hemoglobina, TBARS e ERO podem sugerir efeito antioxidante da hidroxiureia, *in vivo*, e pode permitir o uso futuro destes marcadores no acompanhamento dos pacientes com DF. Novos estudos devem ser realizados no sentido de aprofundar estes conhecimentos em esquemas terapêuticos mais longos com a hidroxiureia.

## 6.6 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

A avaliação do estado de estresse oxidativo envolve a determinação de diferentes biomarcadores, tendo sido descritas na literatura diversas técnicas em diferentes modelos celulares. Como a determinação proposta ocorreu em amostras de sangue de pacientes pediátricos sabidamente anêmicos a primeira dificuldade encontrada foi o volume de amostra necessário para o isolamento dos eritrócitos, o que limitou a quantidade de biomarcadores analisados. A proposta inicial incluía técnicas automatizadas com a utilização de kits comerciais, o que se tornou inviável devido ao alto custo dos reagentes e à falta de financiamento para o projeto. Somado a isto, a falta de adesão ao tratamento e de retorno dos pacientes às consultas, reduziu o número de análises e constituiu-se a maior limitação deste trabalho.



## 7. CONCLUSÕES

A partir do estudo de 41 pacientes diagnosticados com Doença Falciforme e atendidos no Ambulatório de Hematopediatria do HC/UFPR e submetidos a tratamento com hidroxiureia, com idades de 2 a 14 anos, em relação a grupo controle constituído de 280 crianças consideradas normais, com idades de 7 a 11 anos, participantes de Projeto de Extensão universitária, pode-se concluir que:

a) Os pacientes com DF apresentaram:

- Diminuição nas contagens de eritrócitos, dosagem de hemoglobina, porcentagem de hematócrito e concentração de hemoglobina corpuscular média; aumento no volume corpuscular médio e nas contagens de leucócitos, plaquetas e reticulócitos, em relação ao grupo controle;
- Aumento nos parâmetros laboratoriais bilirrubinas, aspartato aminotransferase e lactato desidrogenase, em relação a valores de normalidade estabelecidos na literatura;
- Aumento nas porcentagens de meta-hemoglobina e hemólise, e nas concentrações de TBARS e espécies reativas de oxigênio, em relação ao grupo controle.

b) Com relação aos parâmetros relacionados ao estresse oxidativo:

- Não foram observadas diferenças significativas entre subgrupos de pacientes HbSS, HbSC e HbS- $\beta$  talassemia, com DF;
- Não foram observadas diferenças significativas entre os diferentes haplótipos da  $\beta$  globina na DF.

c) Após o tratamento com hidroxiureia foram observadas:

- Alterações significativas, com redução nas contagens de leucócitos e aumento do volume corpuscular médio e concentração de HbF;
- Redução significativa nas atividades de lactato desidrogenase;
- Reduções significativas nos parâmetros relacionados ao estresse oxidativo meta-hemoglobina, TBARS, atividade enzimática da catalase e ERO.

## REFERÊNCIAS

- ADESANOYE, O. A.; MOLEHIN, O. R.; DELIMA, A. A.; ADEFEGHA, A. S.; FAROMBI, E. O. Modulatory effect of methanolic extract of *Vernonia amygdalina* (MEVA) on tert-butyl hydroperoxide-induced erythrocyte haemolysis. **Cell Biochemistry and Function**, 2012.
- AJUWON, O.R.; KATENGA-THAMAHANE, E.; VAN ROOYEN, J.; OGUNTIBEJU, O.O.; MARNEWICK, J.L. Protective effects of Rooibos (*Aspalathus linearis*) and/or Red Palm Oil (*Elaus guineensis*) supplementation on tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative hepatotoxicity in Wistar rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. 2013.
- AKINSHEYE, I.; ALSULTAN, A.; SOLOVIEFF, N.; NGO, D.; BALDWIN, C. T. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia. **Blood**, v. 118, n. 1, p. 19-27, 2011.
- ALJUBURI, G.; LAVERTY, A. A.; GREEN, S. A.; PHEKOO, K. J.; BELL, D.; MAJEED, A. Socio-economic deprivation and risk of emergency readmission and inpatient mortality in people with sickle cell disease in England: observational study. **Journal of Public Health**. v. 35, n. 4, p. 510–517, 2013.
- ALMEIDA, C. B.; SCHEIERMANN, C.; JANG, J.; PROPHETE, C.; COSTA, F. F.; CONRAN, N.; FRENETTE, P. S. Hydroxyurea and a cGMP-amplifying agent have immediate benefits on acute vaso-occlusive events in sickle cell disease mice. **Blood**, v. 120, n. 14, 2879-2888, 2012.
- ALSULTAN, A. I.; SEIF, M. A.; AMIN, T. T.; NABOLI, M.; ALSULIMAN, A. M. Relationship between oxidative stress, ferritin and insulin resistance in sickle cell disease. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**. v. 14, n. 6, p. 527-538, 2010.
- ALVES, A.L. Estudo da mortalidade por anemia falciforme. **Informe Epidemiológico do SUS**. n. 5, p. 45-53, 1996.
- ANDERSEN, H. R.; NIELSEN, J. B.; NIELSEN, F.; GRANDJEAN, P. Antioxidative enzyme activities in human erythrocyte. **Clinical Chemistry**. v. 43, n. 4, p. 562-568, 1997.

ANTWI-BOASIAKO, C.; FRIMPONG, E.; ABABIO, G. K.; BARTHOLOMEW, D.; CAMPBELL, A. D.; GYAN, B.; ANTWI, D. A. The Role of Nitric Oxide in Vaso-occlusive Crisis in Sickle Cell Disease Patients in Ghana. **Donnish Journal of Medicine and Medical Sciences**. v. 2, n. 4, p. 52-55, 2015.

ASLAN, M; FREEMAN, B. A. Redox-dependent impairment of vascular function in sickle cell disease. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 43, p. 1469–1483, 2007.

ASLAN, M; THORNLEY-BROWN, D.; FREEMAN, B. A. Reactive species in sickle cell disease. **Reactive Oxygen Species: From Radiation to Molecular Biology**. v. 899, p. 375–391, 2000.

AYGUN, B.; MORTIER, N. A.; SMELTZER, M. P.; SHULKIN, B. L.; HANKINS, J. S.; WARE, R. E. Hydroxyurea treatment decreases glomerular hyperfiltration in children with sickle cell anemia. **American Journal of Hematology**. v. 88, p. 116 -119, 2013.

BALAJI, S. N.; TRIVEDE, V. Extracellular methemoglobin mediated early ROS spike triggers osmotic fragility and RBC destruction: an insight into the enhanced hemolysis during malaria. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**. v. 27, n. 2, p. 178-185, 2012.

BANDEIRA, F. M. G. C.; PERES, J. C.; CARVALHO, E. J.; BEZERRA, I.; ARAÚJO, A. S.; MELLO, M. R. B.; MACHADO, C. Hydroxyurea in sickle cell disease patients in Recife, Brazil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 26, n. 3, p. 189-194, 2004.

BANERJEE, A.; KUNWAR A.; MISHRA, B.; PRIYADARSINI, K. I. Concentration dependent antioxidant/pro-oxidant activity of curcumin studies from AAPH induced hemolysis of red blood cells. **Chemico-Biological Interactions**. v. 172. n. 2. p. 134-139, jul. 2008.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, P. D. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quimica Nova**. v. 29, n. 1, p. 113 – 123, 2006.

BELINI JUNIOR, E.; SILVA, D.G.H.; TORRES, L.S.; ALMEIDA, E.A.; CANCADO, R.D.; CHIATTONE, C.; BONINI-DOMINGOS, C.R. Oxidative stress and antioxidant capacity in sickle cell anaemia patients receiving different treatments and medications for different periods of time. **Annals of Hematology**. v. 91, p. 479–489, 2012.

BELISÁRIO, A. R.; MARTINS, M. L.; BRITO, A. M. S.; RODRIGUES, C. V.; SILVA, C. M.; VIANA, M. B.  $\beta$ -Globin gene cluster haplotypes in a cohort of 221 children with sickle cell anemia or S $\beta$ 0-thalassemia and their association with clinical and hematological features. **Acta haematologica**. v. 124, n. 3, p. 162-170, 2010.

BENDOVA, P.; MACKOVA, E.; HASKOVA, P.; VAVROVA, A.; JIRKOVSKY, E.; STERBA, M.; POPELOVA, O.; KALINOWSKI, D. S. KOVARIKOVA, P.; VAVROVA, K.; RICHARDSON, D. R.; SIMUNEK, T. Comparison of clinically used and experimental iron chelators for protection against oxidative stress-induced cellular injury. **Chemical Research in Toxicology**, v. 23, p. 1105-1114, 2010.

BEUTLER, E.; DERN, R. J.; ALVING, A. S. The hemolytic effect of primaquine. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**. v. 45, p. 40-45, 1963.

BEUTLER, E. **Red cell metabolism: a manual of biochemical methods**. 3. ed. Orlando: Grime & Stratton, 1984.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria número 822 de 06 de junho de 2001**. Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2001/prt0822\\_06\\_06\\_2001.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2001/prt0822_06_06_2001.html). Acesso em: 17/02/2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Saúde Suplementar (ANS). **Boletim Brasileiro de Avaliação de Tecnologias em Saúde (BRATS)**. Ano IV, n. 7, Março de 2009.

BRASIL. Departamento de Gestão e Incorporação de Tecnologias em Saúde da Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos – DGITS/SCTIE. **Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS (CONITEC)**. Portaria n. 27 de 12 de junho de 2013.

BRASIL. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Resolução n. 30, de 30 de junho de 2015. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 01 jul. 2015. Seção 1, p. 49.

BRAUNWALD, E.; FAUCI, A. S.; HAUSER, S. L.; JAMERSON, J. L.; KASPER, D. L.; LONGO, D. L. **Medicina interna de Harrison**. 18. ed. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill, 2013.

BURTIS, C. A.; ASHWOOD, E. R.; BRUNS, D. E. **Tietz, fundamentals of clinical chemistry**. 6. ed. Philadelphia: Saunders, 2008.

CANÇADO, R.D. Sobrecarga e quelação de ferro na anemia falciforme. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v. 29, n. 3, p. 316 - 326, jul/set. 2007.

CANÇADO, R. D.; JESUS, J. A. A doença falciforme no Brasil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v. 29, n. 3, p. 204, 2007.

CARVALHO DOS SANTOS, B. S.; DIAS-ELIAS, D. B.; SILVA-ROCHA, L. B.; CAVALCANTE-BARBOSA, M.; PINHEIRO-GONÇALVES, R. Impact of bS-globin haplotypes on oxidative stress in patients with sickle cell anemia in steady state. **Archives of Medical Research**. v. 43, p. 536 – 540, 2012.

CESQUINI, M.; TORSONI, M. A.; STOPPA, G. R.; OGO, S. H. t-BOOH-induced oxidative damage in sickle red blood cells and the role of flavonoides. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 57. p. 124-129, 2003.

CHARACHE, S.; DOVER, G.J.; MOORE, R. D.; ECKERT, S.; BALLAS, S. K.; KOSHY, M.; MILNER, P. F.; ORRINGER, E. P.; PHILLIPS, G. PLATT, O. S. Hydroxyurea: effects on hemoglobin F production in patients with sickle cell anemia. **Blood**. v. 79, n. 10, p. 2555–2565, 1992.

CHARACHE, S.; TERRIN, M. MOORE, R. D.; DOVER, G.J.; BARTON, F. B.; ECKERT, S. V; MCMAHON, R. P.; BONDS, D. R. Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crisis in sickle cell anemia. **The New England Journal of Medicine**. v. 332, n. 20, p. 1317–1322, 1995.

CHAUDHURI, S.; BANERJEE, A.; BASU, K.; SENGUPTA, B.; SENGUPTA, P. K. Interaction of flavonoids with red blood cell membrane lipids and proteins: antioxidant and antihemolytic effects. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 41. p. 42 – 48, 2007.

CHAVES, M. A. F.; LEONART, M. S. S. NASCIMENTO, A. J. Oxidative process in erythrocytes of individuals with hemoglobin S. **Hematology**. v. 13, n. 3, p. 187 – 192, 2008.

CHIRICO, E. N.; PIALOUX, V. Role of oxidative stress in the pathogenesis of sickle cell disease. **IUBMB life**. v. 64, n. 1, p. 72-80, 2012.

CHO, C. S.; KATO, G. J.; YANG, S. H.; BAE, S. W.; LEE, J. S.; GLADWIN, M. T.; RHEE, S. G. Hydroxyurea-induced expression of glutathione peroxidase 1 in red blood cells of individuals with sickle cell anemia. **Antioxidants & redox signaling**. v. 13, n. 1, p. 1-11, 2010.

CLARK, M. R.; MORRISON, C. E.; SHOHET, S. B. Monovalent cation transport in irreversibly sickled cells. **Journal of Clinical Investigation**. v. 62, n. 2, p. 329–337, 1978.

CLARO, L.M.; LEONART, M.S.S.; COMAR, S.R.; NASCIMENTO, A.J. Effect of vitamins C and E on oxidative processes in human erythrocytes. **Cell Biochemistry and Function**. v. 24, p. 531 – 535, 2006.

COLELLA, M. P.; DE PAULA, E. V.; CONRAN, N.; MACHADO-NETO, J. A.; ANNICCHINO-BIZZACCHI, J. M.; COSTA, F. F.; SAAD, S. T. O.; TRAINA, F. Hydroxyurea is associated with reductions in hypercoagulability markers in sickle cell anemia. **Journal of Thombosis and Haemostasis**. v. 10, p. 1967-1970, 2012.

COVAS, D. T.; ANGULO, I. L.; PALMA, P. V. B.; ZAGO, M. Effects of hydroxyurea on the membrane of erythrocytes and platelets in sickle cell anemia. **Haematologica**, v. 89, p. 273-280, 2004.

DAAK, A. A.; GHEBREMESKEL, K.; MARINIELLO, K.; ATTALLAH, B.; CLOUGH, P.; ELBASHIR, M. I. Docosaehaenoic and eicosapentaenoic acid supplementation does not exacerbate oxidative stress or intravascular haemolysis in homozygous sickle cell patients. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)**. v. 89, n. 5, p. 305-311, 2013.

DASGUPTA, T.; FABRY, M. E.; KAUL, D. K. Antisickling property of fetal hemoglobin enhances nitric oxide bioavailability and ameliorates organ oxidative stress in transgenic-knockout sickle mice. **American Journal of Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**. v. 298, n. 2, p. 394 - 402, 2010.

DAVIES, B.W.; KOHANSKI, M. A.; SIMMONS, L. A.; WINKLER, J. A.; COLLINS, J. J.; WALKER, G. C. Hydroxyurea induces hydroxyl radical-mediated cell death in *Escherichia coli*. **Molecular Cell**. v. 36, n. 5, p. 845-860, 2009.

DOMANSKI, A. V.; LAPSHINA, E. A.; ZAVODNIK, I. B. Oxidative processes induced by tert-butyl hydroperoxide in human red blood cells: chemiluminescence studies. **Biochemistry**. v. 70, n. 7, p. 761-769, 2005.

EL-GHAMRAWYA, M. K.; HANNA, W. M.; ABDEL-SALAMA, A.; EL-SONBATY, M. M.; YOUNESS, E. R.; ADEL, A. Oxidant-antioxidant status in egyptian children with sickle cell anemia: a single center based study. **Jornal de Pediatria**. v. 90, n. 3, p. 286-292, 2014.

FAILACE R.; FERNANDES, F. B.; FAILACE, R. **Hemograma: manual de interpretação**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

FARHUD, D. D.; YAZDANPANA, L. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency. **Iranian Journal of Public Health**. v. 37, n. 4, p. 1-18, 2008.

FATIMA, M.; KESHARWANI, R. K.; MISRA, K.; RIZVI, S. I. Protective effect of theaflavin on erythrocytes subjected to *In Vitro* oxidative stress. **Biochemistry Research International**. v. 2013.

FELIX, A. A.; SOUZA, H. M.; RIBEIRO, S. B. F. Aspectos epidemiológicos e sociais da doença falciforme. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v. 32, n. 3, p. 203-208, 2010.

FERNANDES, T. A. A. M.; MEDEIROS, T. M. D.; ALVES, J. J. P.; BEZERRA, C. M.; FERNANDES, J. V.; SERAFIM, E. S. S.; FERNANDES, M. Z.; SONATI, M. F. Socioeconomic and demographic characteristics of sickle cell disease patients from a low-income region of northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v. 37, n. 3, p. 172-177, 2015.

FERSTER, A.; VERMYLEN, C.; CORNU, G.; BUYSE, M.; CORAZZA, F.; DEVALCK, C.; FONDU, P.; TOPPET, M.; SARIBAN, E. Hydroxyurea for treatment of severe sickle cell anemia: a pediatric clinical trial. **Blood**. v. 88, n. 6, p. 1960-1964, 1996.

FLANAGAN, J. M.; HOWARD, T. A.; MORTIER, N.; AVLASEVICH, S. L.; SMELTZER, M. P.; WU, S.; DERTINGER, S. D.; WARE, R. E. Assessment of genotoxicity associated with hydroxyurea therapy in children with sickle cell anemia. **Mutation Research**. n. 698, p. 38-42, 2010.

FURMAN, A. E. F.; HENNEBERG, R.; HERMANN, P. B.; LEONART, M. S. S.; NASCIMENTO, A.J. Ginkgo biloba extract (EGb 761) attenuates oxidative stress induction in erythrocytes of sickle cell disease patients. **Brasiliian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 48, n. 4, p. 659-665, 2012.

GENOME RESEARCH LIMITED, 2015. Disponível em: <<http://www.yourgenome.org/facts/what-is-sickle-cell-anaemia>>. Acesso em 20 de junho de 2015.

GEORGE, A.; PUSHKARAN, S.; KONSTANTINIDIS, D. G.; KOOCHAKI, S.; MALIK, P.; MOHANDAS, N.; ZHENG, Y.; JOINER, C. H.; KALFA, T. A. Erythrocyte NADPH oxidase activity modulated by Rac GTPases, PKC, and plasma cytokines contributes to oxidative stress in sickle cell disease. **Blood**. v. 88, p. 116-119, 2013.

GLADER, B. E.; NATHAN, D. G. Cation permeability alterations during sickling: relationship to cation composition and cellular hydration of irreversibly sickled cells. **Blood**. v. 51, n. 5, p. 983-989, 1978.

GIZI, A.; PAPASSOTIRIOU, I.; APOSTOLAKOU, F.; LAZAROPOULOU, C.; PAPASTAMATAKI, M.; KANAVAKI, I.; KALOTYCHOU, V.; GOUSSETIS, E.; KATTAMIS, A.; ROMBOS, I.; KANAVAKIS, E. Assessment of oxidative stress in patients with sickle cell disease: The glutathione system and the oxidant–antioxidant status. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**. n. 46, p. 220–225, 2011.

GREEN, N. S.; BARRAL, S. Emerging science of hydroxyurea therapy for pediatric sickle cell disease. **Pediatric Research**. v. 75, n. 1, p. 196-204, 2014.

GREEN, N. S.; BARRAL, S. Genetic modifiers of HbF and response to hydroxyurea in sickle cell disease. **Pediatric Blood Cancer**. v. 56, p. 177–181, 2011.

GREENWAY, A.; WARE, R. E.; THORNBURG, C. D. Long-term results using hydroxyurea/phlebotomy for reducing secondary stroke risk in children with sickle cell anemia and iron overload. **American Journal of Hematology**. v. 86, p. 357-361, 2011.

HANKINS, J. S.; WARE, R. E.; ROGERS, Z. R.; WYNN, L. W.; LANE, P. A.; SCOTT, J. P.; WANG, W. C. Long-term hydroxyurea therapy for infants with sickle cell anemia: the HUSOFT extension study. **Blood**. v. 106, n. 7, p. 2269-2275, 2005.



HANSON, M. S.; PIKNOVA, B.; KESZLER, A.; DIERS, A. R.; WANG, X.; GLADWIN, M. T.; HILLERY, C. A.; HOGG, N. Methaemalbumin formation in sickle cell disease: effect on oxidative protein modification and HO-1 induction. **British Journal of Haematology**. v. 154, p. 502-511, 2011.

HEENEY, M. M.; WARE, R. E. Hydroxyurea for children with sickle cell disease. **Pediatric Clinics of North America**. v. 55, p. 483–501, 2008.

HENNEBERG, R. **Estudo do efeito antioxidante de polifenóis em eritrócitos de pacientes de hemoglobina S**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

HERMANN, P. B.; HENNEBERG, R.; NASCIMENTO, A. J.; LEONART, M. S. S. Erythrocyte oxidative stress markers in children: a clinical laboratory experience. **Journal of Pediatric Biochemistry**, v. 5, n. 1, p. 28-33, 2015.

HERMANN, P. B.; HENNEBERG, R.; SPEZIA, J.; NASCIMENTO, A. J.; LEONART, M. S. S. Determination of reactive oxygen species in isolated erythrocytes. **International Journal of Pharmaceutical Research & Analysis**. v. 4, n. 4, p. 260-4, 2014.

JONES, H.; BLINDER, M.; ANADKAT, M. Cutaneous manifestations of sickle cell disease. **Open Journal of Blood Diseases**. v. 3. p. 94-99, 2013.

JÓZWIK, M.; JÓZWIK, M.; JÓZWIK, M.; SZCZYPKA, M.; GAJEWSKA, J.; LASKOWSKA-KLITA, T. Antioxidant defence of red blood cells and plasma in stored human blood. **Clinica Chimica Acta**. v. 267, p. 129-142, 1997.

KIM, Y.S.; HWANG, J.W.; KANG, S.H.; KIM, E.H.; JEON, Y.S.; JEONG, J.H.; KIM, H.R.; MOON, S.H.; JEON, B.T.; PARK, P.J. Thymol from *Thymus quinquecostatus* Celak. protects against tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative stress in Chang cells. **Journal of Natural Medicine**. v. 68, p. 154-162, 2014.

KINNEY, T.R.; HELMS, R.W.; O'BRANSKI, E.E.; OHENE-FREMPONG, K.; WANG, W.; DAESCHNER, C.; VICHINSKY, E.; REDDING-LALLINGER, R.; GEE, B.; PLATT, O. S.; WARE, R. E. Safety of hydroxyurea in children with sickle cell anemia: results of the HUG-KIDS study, a phase I/II trial, Pediatric Hydroxyurea Group. **Blood**. v. 94, n. 5, p. 1550-1554, 1999.

KONDO, H.; TAKAHASHI, M.; NIKI, E. Peroxynitrite-induced hemolysis of human erythrocytes and its inhibition by antioxidants. **Febs Letters**. v. 413, n. 2, p.236-238, 1997.

KORNBERG, A.; HORECKER, B. L.; COLOWICK, S. P.; KAPLAN, N. O. **Methods in enzymology**. Vol. 1. New York: Academia Press, 1955. p. 323.

LERVOLINO, L. G.; BALDIN, P. E. A.; PICADO, S. M.; CALIL, K. B.; VIEL, A. A.; CAMPOS, L. A. F. Prevalence of sickle cell disease and sickle cell trait in national neonatal screening studies. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v. 33, n. 1, p. 49 – 54, 2011.

LEWIS, S. M.; BAIN, B. J.; BATES, I. **Hematologia Prática de Dacie e Lewis**. 9. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

LEWIS, R. A.; KAY, R. W.; HATHORN, M. Sickle cell disease and glucose 6-phosphate dehydrogenase. **Acta Haematology**. v. 36, p. 399-411, 1966.

LOBO, C. L. C. Sickle cell disease - a serious problem for public health worldwide. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. n. 32, v. 4, p. 280-281, 2010.

LOBO, C. L. C.; BALLAS, S. K.; DOMINGOS, A. C. B.; MOURA, P. G.; NASCIMENTO, E. M.; CARDOSO, G. P.; CARVALHO, S. M. F. Newborn Screening Program for Hemoglobinopathies in Rio de Janeiro, Brazil. **Pediatric Blood & Cancer**. v. 61, p. 34-39, 2014.

LOBO, C. L. C.; HANKINS, J. S.; MOURA, P.; PINTO, J. C. Hydroxyurea therapy reduces mortality among children with sickle cell disease. ASH annual meeting abstracts: abstract reporting reduced mortality of children with SCA and hydroxyurea exposure in a Brazilian cohort. **Blood**. v. 116, p. 843, 2010.

LOHR, G. W. WALLER, H. D. **Glucose-6-phosphate dehydrogenase: Methods of enzymatic analysis**. 3. ed. Varlay Chemie, Wheim, 1974. p. 636.

LÓPEZ-REVUELTA, A.; SÁNCHEZ-GALLEGU, J. I.; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, A.; SÁNCHEZ-YAGÜE, J.; LLANILLO, M. Membrane cholesterol contents influence the protective effects of quercetin and rutin in erythrocytes damaged by oxidative stress. **Chemico-Biological Interactions**. v. 161, p. 79 – 91. 2006.

LUZZATTO, L., ALLAN, N. C. Relationship between the genes for glucose 6-phosphate dehydrogenase and haemoglobin in a Nigeria population. **Nature**. v. 219, p. 1041-1042, 1968.

LUKENS, J. N. Deficiências de glucose 6-fosfato desidrogenase e deficiências relacionadas que envolvem a via das pentoses fosfato e metabolismo da glutatona. In: LEE, G. R.; BITHELL, T. C.; FOERSTER, J.; ATHENS, J. W.; LUKENS, J. N. **Wintobe: Hematologia Clínica**. São Paulo: Editora Manole, 1998. p. 1101-1119.

MACK, A. K.; KATO, G. J. Sick cell disease and nitric oxide: a paradigm shift? **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v. 38, n. 8, p. 1237-1243, 2006.

MAGALHÃES, S. M. M. Oxidative status in sickle cell anemia. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v. 33, n. 3, p. 172-178, 2011.

MAKAREM, A. **Clinical Chemistry – Principles and Techniques**. 2. ed. R.F. Henry; D.C. Cannon; J.W. Wilkerman Editors. Harper and How, Hagerstown, 1974. p. 1128 – 1135.

MANFREDINI, V.; LAZZARETTI, L. L.; GRIEBELER, I. H.; SANTIN, A. P.; BRANDÃO, V. D. M.; WAGNER, S.; BENFATO, M. S. Blood antioxidant parameters in sickle cell anemia patients in steady state. **Journal of the National Medical Association**. v. 100, n.8, p. 897, 2008.

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. **European Journal of Biochemistry**. v. 47, p. 469-474, 1974.

MARTI, H. R.; SCHOEPP, K.; GSELL, O. R. Frequency of haemoglobin S and glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency in Southern Tanzania. **British Medicine Journal**. v. 1, p. 1476-1477, 1965.

MCCAVIT, T. L.; LIN, H.; ZHANG, S.; AHN, C.; QUINN, C. T.; FLORES, G. Hospital volume, hospital teaching status, patient socioeconomic status, and outcomes in patients hospitalized with sickle cell disease. **American Journal of Hematology**. v. 86, n. 4, p.377–380, 2011.

MCGANN, P. T.; NERO, A. C.; WARE, R. E. Current management of sickle cell anemia. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**. v. 3, n. 8, p. 1-17, 2013.

MCGANN, P. T.; SPARREBOOM, A.; MORTIER, N. A.; AYGUN, B.; HOWARD, T. A.; NOTTAGE, K.; WARE, R. E. Hydroxyurea pharmacokinetics for predicting maximum tolerated dose in children with sickle cell anemia. **Blood**. v. 124, n. 21, p. 2707, 2014.

MCGANN, P. T.; WARE, R. E. Hydroxyurea for sickle cell anemia: What have we learned and what questions still remain? **Current Opinion Hematology**. v. 18, n. 3, p. 158 – 165, 2011.

MCLELLAN, S. A.; MCCLELLAND, D. B. L.; WALSH, T. S. Anaemia and red blood cell transfusion in the critically ill patient. **Blood Reviews**, v. 17, p. 195 – 208, 2003.

MOHANTY, J. G.; NAGABABU, E.; RIFKIND, J. M. Red blood cell oxidative stress impairs oxygen delivery and induces red blood cell aging. **Frontiers in physiology**. v. 5, 2014.

MOORE, R. D.; CHARACHE, S.; TERRIN, M. L.; BARTON, F. B.; BALLAS, S. K. Cost-effectiveness of hydroxyurea in sickle cell anemia. **American Journal of Hematology**, v. 64, p. 26-31, 2000.

MUTHIAH, M.; SIVANANDHAM, R.; KHANDELWAL, K. R. S.; MOHAN, S. K. Analysis of serum oxidant – antioxidant status in patients with iron deficiency anemia. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**. v. 4, n. 3, p. 449-453, 2013.

NAKAYASHIKI, T.; MORI, H. Genome-wide screening with hydroxyurea reveals a link between nonessential ribosomal proteins and reactive oxygen species production. **Journal of Bacteriology**. v. 195, n. 6, p. 1226-1235, 2013.

NAOUM, P.C. RADISPIEL, J.; MORAES, M. S. Dosagem espectrométrica de meta-hemoglobina sem interferentes químicos ou enzimáticos. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v. 26, n. 1, p. 19-22, 2004.

NAZIROĞLU, M. Molecular role of catalase on oxidative stress-induced Ca<sup>2+</sup> signaling and TRP cation channel activation in nervous system. **Journal of Receptors and Signal Transduction**. v. 32, n. 3, p. 134-141, 2012.

NIKI, E.; KOMURO, E.; TAKAHASHI, M.; URANOZ, S.; ITOS, E.; TERAOE, K. Oxidative Hemolysis of Erythrocytes and its inhibition by free radical scavengers. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 263, n. 36, p. 19809-19814, 1988.

NUR, E.; BIEMOND, B. J.; OTTEN, H. M.; BRANDJES, D. P.; SCHNOG, J. J. B. Oxidative stress in sickle cell disease; pathophysiology and potential implications for disease management. **American Journal of Hematology**. v. 86, p. 484–489, 2011.

OWUSU-OFORI, S.; HIRST, C. Splenectomy versus conservative management for acute sequestration crises in people with sickle cell disease. **The Cochrane Library**, 2013.

PEREIRA, S. A.; BRENER, S.; CARDOSO, C. S.; PROIETTI, A. B. Sickle cell disease: quality of life in patients with hemoglobin SS and SC disorders. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v. 35, n. 5, p. 325–331, 2013.

PIOMELLI, S.; REINDORF, C. A.; ARZANIAN, M. T. Clinical and biochemical interactions of glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency and sickle cell anemia. **New England Journal of Medicine**. v. 287, p. 213-217, 1972.

PLATT, O.S.; ORKIN, S.H.; DOVER, G.; BEARDSLEY, G. P.; MILLER, B.; NATHAN, D. G. Hydroxyurea enhances fetal hemoglobin production in sickle cell anemia. **Journal of Clinical Investigation**. v. 74, n. 2, p. 652–656, 1984.

RAJ, A. B.; BERTOLONE, S. Sickle Cell Anemia. **Medscape**, 2010. Disponível em: <<http://emedicine.medscape.com/article/958614-overview>>. Acesso em: 10/02/ 2013.

RAMALHO, A. S.; MAGNA, L. A.; PAIVA-E-SILVA, R. B. A Portaria nº 822/01 do Ministério da Saúde e as peculiaridades das hemoglobinopatias em saúde pública no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**. v. 19, n. 4, jul./ago. 2003.

REES, D. C.; GIBSON, J. S. Biomarkers in sickle cell disease. **British Journal of Haematology**. v. 156, p. 433-445, 2011.

ROPER, D.; LAYTON, M.; LEWIS, S. M. Investigação das anemias hemolíticas hereditárias: anormalidades da membrana e de enzimas. In: LEWIS, S. M.; BRAIN, B. J.; BATES, In: **Hematologia prática de Dacie e Lewis**. 9. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. p. 163 – 190.

RUIZ, M. A. Anemia falciforme: objetivos e resultados no tratamento de uma doença de saúde pública no Brasil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v. 29, n. 3, p. 203, 2007.

RUSANOVA, I.; ESCAMES, G.; COSSIO, G.; BORACE, R. G.; MORENO, B.; CHAHBOUNE, M.; LÓPEZ, L. C.; DÍEZ, T.; ACUÑA-CASTROVIEJO, D. Oxidative stress status, clinical outcome, and  $\beta$ -globin gene cluster haplotypes in pediatric patients with sickle cell disease. **European Journal of Haematology**. v. 85, p. 529–537, 2010.

SABARENSE, A. P.; LIMA, G. O.; SILVA, L. M. L.; VIANA, M. B. Characterization of mortality in children with sickle cell disease diagnosed through the Newborn Screening Program. **Jornal de Pediatria**. v. 91, n. 3, p. 242-247, 2015.

SANTOS, A. F. **Ação de desferoxamina e deferiprona em eritrócitos de portadores de  $\beta$ -talassemia submetidos a sobrecarga oxidativa de *terc*-butilhidroperóxido, *in vitro***. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

SANTOS, J. P.; GOMES NETO, M. Sociodemographic aspects and quality of life of patients with sickle cell anemia. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v. 35, n. 4, p. 242-245, 2013.

SCHECHTER, A. N.; NOGUCHI, C. T. Sickle hemoglobin polymer: structure-function correlates. In: EMBURY, S. H.; HEBBEL, R. P.; MOHANDAS, N.; STEINBERG, M. H. **Sickle cell disease: basic principles and clinical practice**. New York: Raven Press, 1994, p. 33–51.

SEGAL, J. B.; STROUSE, J. J.; BEACH, M. C.; HAYWOOD, C.; WITKOP, C.; PARK, H.; WILSON, R. F.; BASS, E. B.; LANZKRON, S. Hydroxyurea for the treatment of sickle cell disease. **Agency for Healthcare Research and Quality: Evidence Reports/Technology Assessments**, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK38499/>>. Acesso em: 10/02/ 2013.

SILVA, D. G. H.; BELINI JUNIOR, E.; TORRES, L. S.; JÚNIOR, O. R.; LOBO, C. C.; BONINI-DOMINGOS, C. R.; ALMEIDA, E. A. Relationship between oxidative stress, glutathione S-transferase polymorphisms and hydroxyurea treatment in sickle cell anemia. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**. v. 47, n. 1, p. 23-28., 2011.

SILVA, D. G. H.; BELINI JUNIOR, E.; ALMEIDA, E. A.; BONINI-DOMINGOS, C. R. Oxidative stress in sickle cell disease: An overview of erythrocyte redox metabolism and current antioxidant therapeutic strategies. **Free Radical Biology and Medicine**. n. 65, p. 1101–1109, 2013.

SILVA, M. C.; SHIMAUTI, E. L. T. Effectiveness and toxicity of hydroxyurea in children with sickle cell anemia. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v. 28, n. 2, p. 144-148, 2006.

SILVEIRA, L. Considerações críticas e metodológicas na determinação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em células musculares durante contrações. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**. v. 48, n. 6, p. 812-822, 2004.

SIMÕES, B. P.; PIERONI, F.; BARROS, G. M. N.; MACHADO, C. L.; CANÇADO, R. D.; SALVINO, M. A.; ÂNGULO, I.; VOLTARELLI, J. C. Consenso Brasileiro em Transplante de Células-Tronco Hematopoéticas: Comitê de Hemoglobinopatias. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v. 32 (supl. 1), p. 46-53, 2010.

STEINBERG, M. H. Sickle cell disease and associated hemoglobinopathies. In: GOLDMAN, L.; AUSIELLO, D. **Cecil: Medicine**. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2007. p. 1217 – 1226.

STEINBERG, M. H.; MCCARTHY, W. F.; CASTRO, O.; BALLAS, S. K.; ARMSTRONG, F. D.; SMITH, W.; ATAGA, K.; SWERDLOW, P.; KUTLAR, A.; DECASTRO, L.; WACLAWIW, M. A. The risks and benefits of long-term use of hydroxyurea in sickle cell anemia: A 17,5 year follow-up. **American Journal of Hematology**. v. 85, p. 403–408, 2010.

STROUSE, J. J.; HEENEY, M. M. Hydroxyurea for the treatment of sickle cell disease: efficacy, barriers, toxicity, and management in children. **Pediatric Blood Cancer**. v. 59, p. 365-371, 2012.

STUART, M. J.; NAGEL, R. L. Sickle cell disease. **Lancet**. v. 364, n. 9442, p. 1343 – 1360, 2004.

SUMOZA, A.; BISOTTI, R.; SUMOZA, D.; FAIRBANKS, V. Hydroxyurea (HU) for prevention of recurrent stroke in sickle cell anemia (SCA). **American Journal of Hematology**. v. 71, p. 161–165, 2002.

TANTAWY, A. A. G.; ADLY, A. A. M.; ISMAIL, E. A. R.; ALY, S. H. Endothelial nitric oxide synthase gene intron 4 VNTR polymorphism in sickle cell disease: relation to vasculopathy and disease severity. **Pediatric Blood & Cancer**. v. 62, p. 389-394, 2015.

TEIXEIRA NETO, P. F. ; GONÇALVES, R. P.; ELIAS, D. B. D.; ARAÚJO, C. P.; MAGALHÃES, H. I. F. Analysis of oxidative status and biochemical parameters in adult patients with sickle cell anemia treated with hydroxyurea, Ceará, Brazil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v. 33, n. 3, p. 207-210, 2011.

TELEN, M. J.; KAUFMAN, R.E. The mature erythrocyte. In: GREER, J. P.; FOERSTER, J.; LUKENS, J. N. **Wintrob's Clinical Hematology**. 11. Ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 2004. p. 421–484.

THOMPSON, B. W.; MILLER, S. T.; ROGERS, Z. R.; REES, R. C.; WARE, R. E.; WACLAWIW, M. A.; IYER, R. V.; CASELLA, J. F.; LUCHTMAN-JONES, L.; RANA, S.; THORNBURG, C. D.; KALPATTHI, R. V.; BARREDO, J. C.; BROWN, R. C.; SARNAIK, S.; HOWARD, T. H.; LUCK, L.; WANG, W. C. The pediatric hydroxyurea phase III clinical trial (BABY HUG): challenges of study design. **Pediatric Blood Cancer**. v. 54, p. 250–255, 2010.

THORNBURG, C. D.; DIXON, N.; BURGETT, S.; MORTIER, N. A.; SCHULTZ, W. H.; ZIMMERMAN, S. A.; BONNER, M.; HARDY, K. K.; CALATRONI, A.; WARE, R. E. A pilot study of hydroxyurea to prevent chronic organ damage in young children with sickle cell anemia. **Pediatric Blood Cancer**. v. 52, n. 5, p. 609-615, 2009.

TORRES, L. S.; SILVA, D. G. H.; BELINI JUNIOR, E.; ALMEIDA, E. A.; LOBO, C. L. C.; CANÇADO, R. D.; RUIZ, M. A.; BONINI-DOMINGOS, C. R. The influence of hydroxyurea on oxidative stress in sickle cell anemia. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v. 34 n. 6, p. 421–425, 2012.

UNITED STATES PHARMACOPEIA, 31, 2008-2010. Disponível em: <<http://www.pharmacopeia.cn/usp.asp>>. Acesso em: 20/04/2015.



URSINI, M. V.; PARRELLA, A.; ROSA, G.; SALZANO, S.; MARTINI, G. Enhanced expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase in human cells sustaining oxidative stress. **Biochemical. Journal.** v. 323, p. 801-806, 1997.

VALDATI, K.D.; HENNEBERG, R.; NASCIMENTO, A. J. Hematological reference ranges among healthy adults of Curitiba, PR, Brazil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia.** v. 33 n. 5, p. 393–397, 2011.

VAN RAAMSDONK, J. M.; HEKIMI, S. Superoxide dismutase is dispensable for normal animal lifespan. **Proceedings of the National Academy of Sciences.** v. 109, n. 15, p. 5785-5790, 2012.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. S.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova.** São Paulo, v. 30. n. 5, set/out. 2007.

VICHINSKY, E.; ONYEKWERE, O.; PORTER, J.; SWEREDLOW, P.; ECKMAN, J.; LANE, P.; FILES, B.; HASSELL, K.; KELLY, P.; WILSON, F.; BERNAUDIN, F.; FORNI, G.L.; OKPALA, I.; RESSAYRE-DJAFER, C.; ALBERTI, D.; HOLLAND, J.; MARKS, P.; FUNG, E.; FISCHER, R. MUELLER, B.U.; COATES, T. A randomised comparison of deferasirox versus deferoxamine for the treatment of transfusional iron overload in sickle cell disease. **British Journal of Haematology.** v. 136, p. 501–508, 2006.

VOSKARIDOU, E.; CHRISTOULAS, D.; BILALIS, A.; PLATA, E.; VARVAGIANNIS, K.; STAMATOPOULOS, G.; SINOPOULOU, K.; BALASSOPOULOU, A.; LOUKOPOULOS, D.; TERPOS, E. The effect of prolonged administration of hydroxyurea on morbidity and mortality in adult patients with sickle cell syndromes: results of a 17-year, single-center trial (LaSHS). **Blood,** v. 115, n. 12, p. 2354 – 2363, 2010.

WANG, W. C. Newborn screening for sickle cell disease: necessary but not sufficient **Jornal de Pediatria.** v. 91, n. 3, p. 210-212, 2015.

WANG, W. C. The sickle cell anemia and other sickling syndromes. In: GREER, J. P.; FOERSTER, J.; LUKENS, J. N. **Wintrob's Clinical Hematology.** 11. Ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 2004. p. 2528–2633.

WARE, R.E.; DESPOTOVIC, J.M.; MORTIER, N.A.; FLANAGAN, J.M.; HE, J.; SMELTZER, M.P.; KIMBLE, A.C.; AYGUN, B.; WU, S.; HOWARD, T.; SPARREBOOM, A. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and pharmacogenetics of hydroxyurea treatment for children with sickle cell anemia. **Blood**. v.118, p. 4985–4991, 2011.

WATANABE, A. M. **Frequência dos haplótipos nas hemoglobinopatias falciformes no Estado do Paraná e evolução clínica**. Tese (Doutorado em Saúde da Criança e do Adolescente) Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

WATANABE, A. M.; PIANOVSKI, M. A. D.; ZANIS NETO, J.; LICHTVAN, L. C. L.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A.; DOMINGOS, M. T.; WITTIG, E. O. Prevalence of hemoglobin S in the state of Paraná, Brazil, based on neonatal screening. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro. v. 24, n. 5, p. 993-1000, 2008.

WILD, B.J.; BAIN, B. J. Investigação de hemoglobinas anormais e talassemia. In: LEWIS, S. M.; BAIN, B. J.; BATES, I. In: **Hematologia prática de Dacie e Lewis**. 9. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. p. 272 – 307.

ZWIETEN, R.; VERHOEVEN, A. J.; ROOS, D. Inborn defects in the anti-oxidant systems of human red blood cells. **Free Radical Biology and Medicine**. V. 67, p. 377-386, 2014.


## ANEXOS

### Anexo I - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nós, Priscila Bacarin Hermann e Railson Henneberg, pesquisadores da Universidade Federal do Paraná, estamos convidando o paciente com anemia falciforme sob sua responsabilidade a participar de um estudo intitulado “Avaliação de parâmetros de estresse oxidativo em crianças com anemia falciforme antes e depois do início do tratamento com hidroxiureia” importante para melhorar o tratamento da doença e melhorar a qualidade de vida e a sobrevida da criança.

- a) O objetivo desta pesquisa é realizar alguns exames laboratoriais diferentes dos que já são realizados para avaliar os benefícios do tratamento com hidroxiureia.
- b) Caso você concorde que o paciente participe da pesquisa, será necessário coletar uma amostra de sangue, junto com a coleta que já é realizada normalmente, para esses exames adicionais. A coleta será realizada durante a consulta de rotina com o médico hematologista.
- c) Para tanto, a criança deve comparecer na unidade de hematologia do Hospital de Clínicas da UFPR para a consulta médica de acompanhamento rotineira, na data e horário determinada pelo médico.
- d) Não haverá nenhum risco para o paciente em decorrência dessa pesquisa, pois a coleta de sangue será realizada normalmente, pelo técnico do ambulatório do Hospital de Clínicas.
- e) Os benefícios esperados com essa pesquisa são: comprovar que a hidroxiureia melhora os sintomas da anemia falciforme e fornecer ao médico novas opções de exames para acompanhar o tratamento. No entanto, nem sempre o paciente será diretamente beneficiado com o resultado da pesquisa, mas poderá contribuir para o avanço científico.
- f) O pesquisador Priscila Bacarin Hermann, farmacêutica, aluna do programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, responsável por este estudo poderá ser contatada no endereço Avenida Lothario Meissner, 632 – Jardim Botânico, de segunda a sexta-feira das 8:00 às 17:00, telefones (41) 3360-4084 ou (41) 9621-0918 e e-mail prihermann@hotmail.com, para esclarecer qualquer dúvida que o Sr(a) possa ter antes, durante ou depois de encerrado o estudo.
- g) A participação do paciente sob sua responsabilidade é voluntária e se você decidir que ele não deve mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e solicitar a devolução deste termo de consentimento livre e esclarecido assinado. A sua recusa não implicará na interrupção do tratamento do paciente, que está assegurado.

Aprovado pelo Comitê de Ética  
em Pesquisa do Setor de Ciências  
da Saúde/UFPR. 

Em, 22 / 05 / 2013

Rubricas:

Sujeito da Pesquisa e /ou responsável legal \_\_\_\_\_

Pesquisador Responsável \_\_\_\_\_

Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR

Telefone: (41) 3360-7259 e-mail: cometica.saude@ufpr.br

- h) Você poderá ter acesso às informações sobre o estudo a qualquer momento, com o pesquisador, o professor orientador ou o médico do paciente.
- i) As despesas necessárias para a realização da pesquisa (exames e reagentes) não são de sua responsabilidade e pela participação do paciente no estudo você não receberá qualquer valor em dinheiro. O paciente terá a garantia de que se ocorrer algum problema na coleta de sangue, decorrentes do estudo, o mesmo será tratado no ambulatório de hematologia do Hospital de Clínicas da UFPR.
- j) Quando qualquer informação ou resultado forem divulgados em relatório ou publicação, não aparecerá o nome do paciente, e sim um código, preservando a identidade do paciente e mantendo a confidencialidade.
- k) Solicitamos sua autorização para também acessar os dados do paciente que estão constantes no prontuário médico, como resultados de hemograma e exames bioquímicos, queixas durante a consulta e frequência das internações e transfusões sanguíneas.

Eu, \_\_\_\_\_, responsável pelo paciente \_\_\_\_\_ li esse termo de consentimento e compreendi o objetivo do estudo do qual concordei que ele(a) participe. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios. Eu entendi que sou livre para interromper a participação do paciente sob minha responsabilidade a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem que esta decisão afete seu tratamento. Eu fui informado que o paciente será atendido sem custos se apresentar algum problema dos relacionados no item i.

Eu concordo com a participação voluntária do paciente sob minha responsabilidade neste estudo.

Curitiba, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_

Assinatura do Pesquisador

Aprovado pelo Comitê de Ética  
em Pesquisa do Setor de Ciências  
da Saúde/UFPR.

Em, 22 / 05 / 2013

Rubricas:

Sujeito da Pesquisa e /ou responsável legal \_\_\_\_\_

Pesquisador Responsável \_\_\_\_\_

Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR

Telefone: (41) 3360-7259 e-mail: cometica.saude@ufpr.br

## Anexo II - Termo de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



HOSPITAL DE CLÍNICAS DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
PARANÁ - HCUFPR



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Avaliação de parâmetros de estresse oxidativo em crianças com anemia falciforme antes e depois do início do tratamento com hidroxiureia

**Pesquisador:** Priscila Bacarin Hermann

**Area Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 14226113.8.0000.0102

**Instituição Proponente:** Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 354.032

**Data da Relatoria:** 30/07/2013

#### Apresentação do Projeto:

Adequada.

#### Objetivo da Pesquisa:

Avaliar parâmetros de estresse oxidativo em crianças com anemia falciforme antes e depois do início do tratamento com hidroxiuréia.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Adequada.

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa contribuirá para compreensão do mecanismo de ação da hidroxiuréia e para estabelecer um protocolo de testes de estresse oxidativo a ser utilizado como rotina no acompanhamento dos pacientes com anemia falciforme.

#### Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados.

#### Recomendações:

É obrigatório trazer ao CEP/HC uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido que foi aprovado, para assinatura e rubrica. Após, xerocar este TCLE em duas vias, uma ficará com o

**Endereço:** Rua Gal. Carneiro, 181

**Bairro:** Alto da Glória

**CEP:** 80.060-900

**UF:** PR **Município:** CURITIBA

**Telefone:** (41)3360-1041

**Fax:** (41)3360-1041

**E-mail:** cep@hc.ufpr.br



HOSPITAL DE CLÍNICAS DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
PARANÁ - HCUFPR



Continuação do Parecer: 354.032

pesquisador e uma para o participante da pesquisa.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Projeto e documentações apresentados de forma adequada.

Projeto aprovado pelo CEP Coordenador, e considerado aprovado por este CEP.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HC-UFPR, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/2012, manifesta-se pela aprovação do projeto conforme aprovado pelo CEP Coordenador. Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos. Manter os documentos da pesquisa arquivado.

É dever do CEP acompanhar o desenvolvimento dos projetos, por meio de relatórios semestrais dos pesquisadores e de outras estratégias de monitoramento, de acordo com o risco inerente à pesquisa.

CURITIBA, 08 de Agosto de 2013 .

---

**Assinador por:**  
**Renato Tambara Filho**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Rua Gal. Carneiro, 181

**Bairro:** Alto da Glória

**CEP:** 80.060-900

**UF:** PR


**Município:** CURITIBA

**Telefone:** (41)3360-1041

**Fax:** (41)3360-1041

**E-mail:** cep@hc.ufpr.br

# Anexo III – Certificado do trabalho apresentado sobre a técnica de determinação de ERO



CONGRESSO  
BRASILEIRO  
de HEMATOLOGIA,  
HEMOTERAPIA  
e TERAPIA CELULAR

6 a 9 de novembro de 2014 - Florianópolis/SC/Brasil


---

## CERTIFICADO


---

Certificamos que o trabalho intitulado **"DETERMINAÇÃO DIRETA DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO EM ERIÓCITOS COM OXIDAÇÃO POR TERC-BUTILHIDROPERÓXIDO"** de autoria de Priscila Bacarin Hermann|Ralison Henneberg|Juliana Spezia|Aguiar José do Nascimento|Marta Suely Soares Leonart, foi apresentado no Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular – HEMO 2014, realizado no período de 6 a 9 de novembro de 2014, na categoria painel com visita guiada (Painel 505).


Florianópolis, 09 de Novembro de 2014.



**DIMAS TADEU COVAS**  
PRESIDENTE DA ABHH



**FERNANDO FERREIRA COSTA**  
PRESIDENTE DO HEMO 2014



ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA  
de Hematologia, Hemoterapia  
e Terapia Celular

## Anexo IV – Artigo publicado sobre a técnica de determinação de ERO

Priscila Bacarin Hermann et al. / Vol 4 / Issue 4 / 2014 / 260-264.

260



### International Journal of Pharmaceutical Research & Analysis

e-ISSN: 2249 – 7781  
Print ISSN: 2249 – 779X

www.ijpra.com

#### DETERMINATION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES IN ISOLATED ERYTHROCYTES

**Priscila Bacarin Hermann\*, Railson Henneberg, Juliana Spezia, Aguinaldo José do  
Nascimento, Maria Suely Soares Leonart**

Clinical Laboratory, Department of Clinical Analysis, Universidade Federal do Paraná, Avenida Lothário Meisner,  
632 - Curitiba-Paraná-Brazil.

##### ABSTRACT

Determination of reactive oxygen species (ROS) in erythrocytes have been extensively studied due to its important pathophysiological role in many diseases. Also, studies on the potential of many antioxidants compounds are important to improve human healthy. This paper describes a simple and fast method to quantify ROS in erythrocytes with induction of oxidation and antioxidant protection. Tert-butyl hydroperoxide (tBOOH)-induced ROS was measured in erythrocytes isolated from 60 healthy adults between 21 and 39 years old, using microplates methods in which 2,7-dichlorofluorescein (DCF) was produced. Fluorescence was monitored at 530 nm after excitation at 495 nm. Data points were taken after 15 and 30 min of incubation at room temperature and at 37°C. Ascorbic acid was used to evaluate the protection of an antioxidant compound. Results were analyzed using the Statistica 10.0 (StatSoft). No outlier was identified and all parameters were normally distributed. Data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation and one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey test were performed. Results were considered statistically significant when  $p < 0.05$ . Different concentrations of t-BOOH solutions induced ROS generation with significant differences in all concentrations. Time and temperature interfere in the method that has to be well standardized. Dose-dependent protection of ascorbic acid on ROS production was observed. ROS-induced oxidative stress in erythrocytes and antioxidant protection can be determinate using an easy and fast method, with little blood volume under microplate methods.

**Keywords:** Reactive oxygen species, Erythrocytes, Tert-butyl hydroperoxide, Dichlorodihydrofluorescein-diacetate.



## Anexo V – Artigo publicado sobre valores de referência para os parâmetros relacionados ao estresse oxidativo em crianças normais.



**JPB**  
**JOURNAL OF PEDIATRIC BIOCHEMISTRY**

HOME ABOUT ASSOCIATIONS EDITORS EDITORIAL BOARD INSTRUCTIONS ARCHIVES SUBSCRIPTION THIEME PUBLISHERS CONTACT

**JOURNAL OF PEDIATRIC BIOCHEMISTRY**  
Official Journal of the World Society of Child Science, Türkiye

**LAST ISSUE**  
Volume 5, Number 1, Year 2015

*Mahboob Alam*  
Serum asymmetric dimethylarginine levels in patients with acute rheumatic fever: Inflammation and endothelial dysfunction

*Paul Harold George Hogeman, Marieke Peternella Hoevenaar-Blom, JosPeter Marie Wielders*  
Persistent deficiency for 40% of toddlers who were vitamin D deficient as neonates, which cannot be assessed by examining symptoms of rickets

*Lucia Marsegila, Sara Manti, Gabriella D'Angelo, Caterina Cuppari, Vincenzo Salpietro, Martina Filippelli, Valeria Chirico, Eloisa Gitto, Carmelo Salpietro, Teresa Arriao*  
The role of visfatin in pregnancy, complications and procreation

*Mirela Tondo, Mercedes Casado, Mar O'Callahan, Iolanda Jordan, Laura Altimira, Belen Perez-Dueñas, Alfredo Garcia-Alix, Angels Garcia-Cazorla, Aida Ormazabal, Rafael Artuch*  
Cerebrospinal fluid selenium concentrations in pediatric patients with neurological disorders

*Ahmet Sert, Derya Cimen, Derya Arslan, Ebru Aypar, Husamettin Vatansev, Fatma Kaya, Cengizhan Kilicaslan, Eyup Aslan, Osman Guvenç, Fatmagül Gun, Bulent Oran, Dursun Odabas*  
Serum asymmetric dimethylarginine levels in patients with acute rheumatic fever

*Priscila Bacarin Hermann, Railson Henneberg, Aguinaldo José do Nascimento, Maria Suely Soares Leonart*  
Erythrocyte oxidative stress markers in children: A clinical laboratory experience

*Ali K Alzahrani, Nader M Mohammed, Humaid Al-Sivat, Rehab A Karam*  
Measurement of serum Osteopontin and IL17 in asthmatic children in Saudi Arabia

**J PEDIATR BIOCHEM**  
ISSN: 1879-5390 print, ISSN: 1879-5404 online

[mcemek@yildiz.edu.tr](mailto:mcemek@yildiz.edu.tr)

[f](#) [t](#)

Copyright © World Society of Child Science All Rights Reserved